



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PAPEL CENTRAL DEL BORO EN EL DIÁLOGO MOLECULAR  
DE LA SIMBIOSIS  
*Rhizobium*-LEGUMINOSAS Y EN PROCESOS DE  
ORGANOGENESIS**

***ROLES OF BORON IN MOLECULAR AND CELLULAR  
INTERACTIONS DURING THE *Rhizobium*-LEGUME SYMBIOSIS  
AND PROCESSES OF ORGANOGENESIS***

María Reguera Blázquez

Madrid 2009



**Memoria presentada para optar al Grado  
de Doctor en Ciencias dentro del programa “Biología Vegetal: Aspectos  
Moleculares, Fisiológicos y Biotecnológicos”**

Madrid, Mayo de 2009

Fdo. María Reguera Blázquez  
Licenciada en Ciencias Ambientales

**LOS DIRECTORES**

Dr. Luis Bolaños Rosa  
Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Biología  
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Ildefonso Bonilla Mangas  
Catedrático de Universidad  
Departamento de Biología  
Universidad Autónoma de Madrid





*A mis padres, Carmen y Manolo  
y a la memoria de mis abuelas Amelia y María*



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a mis padres su esfuerzo, dedicación y cariño. Por todo lo que han luchado para darme lo mejor y verme evolucionar en la vida, apoyando mis decisiones y enseñándome a ser mejor persona, y por quererme sin medida. Este trabajo está dedicado especialmente ellos. Gracias.

Evidentemente el trabajo que recogen estas páginas no es exclusivo de la “arriba firmante”, lo integran todas y cada una de las personas que han estado a mi lado y a las que me gustaría reconocer su contribución en estas líneas.

A mis Directores, Alfonso y Luis, gracias por quererme y darme la oportunidad de formar parte de un pequeño gran equipo. Sois los responsables de que este trabajo haya salido adelante, pues sin vuestra ayuda no hubiera sido posible. Habéis creído en mí, aun cuando yo no lo hacía, me habéis animado y otorgado un regalo de valor incalculable, una formación científica y más si cabe humana, que me corresponde conservar.

Diese Arbeit möchte ich auch besonders Prof. Dr. Heiner Goldbach widmen, der mir die Gelegenheit gab, einen hochinteressanten Aufenthalt in Bonn durchzuführen; und Frau Dr. Moni Wimmer, die mich so vieles gelehrt hat, und die mir ständig geholfen hat, und deren Freundschaft ich immer zu behalten hoffe. Danke auch herzlich meinen lieben Kollegen und Freunden des Bereichs für Pflanzenenährung (Tom, Nam, Suni, Jonas, Carsten, Waltraut, Sven, Ivonne, Axel,...)

Specials thanks to Dr. Nick Brewin for his key scientific ideas that have helped us in the development of this work.

Also special thanks to Dr. Trevor Wang who kindly has provided us resources to carry on some experiments of this work.

Al Dr. Manuel Becana, porque gracias a su colaboración hemos podido llevar a cabo muchos de los experimentos que este trabajo recoge. También a Pilar Bustos, quien en todo momento se brindó a ayudarnos.

Al Dr. Carlos Sentís que nos animó a ampliar nuestro trabajo y nos ayudó en la realización de algunos ensayos que aquí se plasman.

A la Dra. Isabel Herráez, pues sé que siempre pensó que yo podía, y confió en mí dándome una oportunidad única, gracias.

A ti Isa, porque más que una amiga eres una hermana. No tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí durante estos años. Solo me cabe sentir de corazón un “gracias por todo”. Eres una pieza clave en mi vida y espero que sigas estando a mi lado.



A Ana, Emma y Vir por vuestra amistad, por vuestra paciencia y cariño, porque me habéis animado, apoyado, ayudado y comprendido en todo momento, gracias por cuidarme, por quererme tal y como soy, y por lo que significáis.

A Fran, porque además de lo importante que para mí es tu amistad, tu ayuda tanto a nivel científico como personal ha sido fundamental, gracias.

A María, por todos los buenos ratos que hemos pasado y tu ayuda en los momentos difíciles.

A Mariam, Silene y Noelia porque por mucho que pase el tiempo siempre estáis ahí, espero no perderos nunca.

A Ester a quien agradezco su cariño, por su integridad personal digna de admiración y por la enorme amistad que nos une, gracias por formar parte de mi vida.

A Mayte, gracias por animarme, por tu paciencia y por escucharme día tras día cuando los días se me hacían muy cuesta arriba.

A Fer, cuyo apoyo ha sido indispensable para mi, mil gracias.

A Jero, Iñaki, Alba y Miriam, que confiáis en mí y me animáis a seguir, gracias por creer en mí.

A Celia y Delia, agradeceros que sigáis ahí a pesar de mi dejadez.

A Paqui, porque he tenido el placer de conocerte, y saber lo que vales, gracias. También dar las gracias a Paco, gracias a los dos, porque sé que los dos me habéis animado a seguir en esto.

A Pili, por tu ánimo, tus consejos y los muchos ratos de desahogo en los que has estado conmigo gracias *mamá Pili*.

A Arse, por tu apoyo, tu ánimo y tu amistad, por los ratos ociosos que nos hemos “echao” y tu disponibilidad permanente para mis múltiples preguntas, gracias de verdad.

A Javi, porque eres genial, a pesar de que te pierdas en esa cabeza tuya a la que me es imposible seguir, gracias por tu amistad y por todo lo que me has enseñado.

A Rafa y Marta porque me habéis aconsejado y animado, y me habéis hecho pasar unos ratos estupendos.

A Paco y Covadonga, gracias por vuestra dedicación, ha sido un placer trabajar con vosotros, y espero poder repetir

A quienes habéis estado y aún estáis ahí: Eva, Edu, Mari y Paco, Berta, Luis Pulido, Cristina Ortega, Rocío, Cristina, Mayte, Nati, Ernesto, Nacho...

A la gente de de la Universidad de Sevilla, especialmente a Isa por lo que vales, por tu paciencia y tu amistad.



A mis niños, que desde hace años “soportan” mis clases: Pablo S., Ignacio, Paloma, Juan y Pablo.

A TODOS mis compañeros de Fisiología vegetal (de arriba y de abajo) pues habéis contribuido de una u otra forma en este trabajo, de todo corazón, GRACIAS. A pesar de no poder nombraros a todos, por cuestión de espacio, creo que sin vuestra ayuda, buenos ratos, comprensión y paciencia (muchacha), esto no hubiera sido posible.

A mi familia, especialmente a mis tí@s Rosa, Amelia, Domingos y a mi padrino por tenerme siempre en vuestros corazones.

Gracias Fran, porque pese a todo me has hecho muy feliz.

Por último me gustaría retomar el agradecimiento a una persona que ha confiado en mí y que ha estado a mi lado incondicionalmente, y que me ha demostrado un cariño, paciencia y apoyo especial, y porque pese a nuestras diferencias no encuentro más que palabras de agradecimiento por su entrega. Porque quizá la falta de entendimiento nos haya unido, y porque le considero responsable principal de este trabajo. Gracias Luis.





**ROLES OF BORON IN MOLECULAR AND CELLULAR  
INTERACTIONS DURING THE *Rhizobium*-LEGUME SYMBIOSIS  
AND PROCESSES OF ORGANOGENESIS**



**Summary of the Thesis submitted to the  
Universidad Autónoma de Madrid for the degree  
of European Doctor of Philosophy**

**May 2009**

**MARÍA REGUERA BLÁZQUEZ**

**Departamento de Biología, Facultad de Ciencias**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Supervisors**

**Dr. LUIS BOLAÑOS ROSA**

**Prof. Dr. ILDEFONSO BONILLA MANGAS**



The work of Katherine Warington (1923) is considered the first showing that boron (B) is required for vascular plants. Since that early report and during the following 60 years, several “postulated roles of B” for higher plant growth and development were described (cited by Parr & Loughman 1983), although only cross-linking of apiose residues by B in the cell wall pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II (RGII) (O’Neill *et al.* 2001) and its appearance in the Autoinductor AI2 implicated in *quorum sensing* (Chen *et al.* 2002) has been convincingly demonstrated. Therefore, much of the numerous biochemical, physiological and anatomical effects of B deficiency in plants often have been considered secondary effects. However, the *in vivo* isolation of other biological B-complexes, including soluble B-sorbitol complexes that helped resolve the problem of the phloem mobility of B (Hu *et al.* 1997), the discovery of *in vitro* binding of B to adenylates (Ralston & Hunt 2001), or the stabilization of cyclic ribose by borate (Ricardo *et al.* 2004), together with increasing evidence for B essentiality in animals (reviewed by Hunt 2007), point to important roles of B beyond RGII dimer formation in cell walls.

The capacity of boric acid and borate to react with hydroxyl groups from biomolecules making them effective, is considered a key for understanding B functions (Bolaños *et al.* 2004), and research should now be focused on discovery of B-complexes with physiological relevance in biological systems. Although analytical procedures have been improved, the low B concentrations in cells make it a difficult challenge. Further progress depends on new methodology with greater analytical capability and/or on the discovery of biological models enriched in B-ligands and therefore highly dependent of the micronutrient, to induce B deficiency in them. This is the case of legume root nodules, which contain enhanced amounts of several plant- and bacteria-derived glyco-

conjugates (Kannenberg & Brewin 1994; Brewin 2004; and refs. therein) that could be potential B-reacting molecules. Actually, B deficiency has a strong effect on development and function of legume nodules (Bolaños *et al.* 1994; 2001; 2004; Bolaños, Brewin & Bonilla 1996; 2001; Bonilla *et al.* 1997) making it a good model for studying the role of B in living beings.

It is important to highlight that it has been demonstrated that B requirement is higher for growing plant organs than for mature ones (reviewed by Bell *et al.* 2002). Nodules are organs with continuous growth until senescence, and evidence that symptoms of B-deficiency appear in nodules early than in other plant organs (Bolaños *et al.* 1994) is on line with a higher B content in nodules than in roots or shoots (Redondo-Nieto *et al.* 2003). In this study, we have investigated the effects of B-deprivation on the capacity of components of pea (*Pisum sativum*) nodules to associate to a borate-binding specific resin, Amberlite IRA743.

Incubation of *Pisum sativum* (pea) nodule extracts with the borate-binding specific resin was performed to capture borate-complexes and these were further identified by MALDI-TOF spectrometry analysis or immunostaining with specific antibodies. Among component associated to amberlite, antigens recognized by MAC 265, by anti-RGII or leghemoglobin were identified.

Legume AGP-extensin (AGPE) localized with MAC265 antibody in the infection threads and in the extracellular matrix of cortical cells, involved in the oxygen diffusion barrier, appeared heavily bound to the borate-capturing resin when the extracts were derived from B-sufficient nodules but not from B-deficient nodules. Furthermore,

MAC265 antigens were abnormally distributed in B-deprived nodules. Besides those glycoproteins, antigens recognized by anti-RGII (rhamnogalacturonan II) derived from +B but not from –B nodules also appeared linked to Amberlite. Immunoprecipitation assays suggested an interaction between RGII and AGPE that seems to be mediated by B, since it depends on the presence of –B as we can see when we added borate to the nodule extracts. Immunocytochemistry studies and previous reports (Bolaños *et al.*, 1996) demonstrated that infection threads developed abnormally in B-deficient nodules. Therefore we suggest from these observations that AGPE is able to react with borate and that the micronutrient is promoting a cross-linking between AGPE and rhamnogalacturonan II, and that this interaction is important for infection thread development and could explain poor invasion of B-deficient nodules.

Moreover, related with inhibition of infection due to B-deficiency, following proteomic studies of nodule extracts, immunological and gene expression studies, we found that at least two PR10 proteins typical of pathogenic infections were early induced in –B nodules or in interactions involving non-invasive rhizobia mutants, altered in cell surface polysaccharides. Therefore, it is likely that those aborted interactions are pathogenic-like rather than symbiotic.

Besides infection threads, AGPE and RGII were abnormally distributed in the cortex, cell walls and intercellular spaces, suggesting an abnormal structure of the oxygen diffusion barrier. Moreover, leghemoglobin concentration, which also appeared associated to the borate-specific resin, largely decreased during development of B-deficient nodules. Therefore, as MAC203 induction showed, an alteration in the internal oxygen concentration can exist in –B nodules. However, the results suggest that there is

no oxidative damage in these tissues, as shown by the no existence of accumulation of oxidized lipid and proteins in B-deprived nodules. Also there existed a decrease in ascorbate peroxidase activity, a major enzyme involved in the defense against activated oxygen in nodules. It could be explained by the fact that the two main sources of ROS production, Lb (Gunther *et al.* 2007) and high rate of bacteroid respiration (Becana *et al.* 2000), are minimized in –B nodules (absence of Lb and poor invasion). Therefore, B deficiency leads to the instability of mechanisms involved in rhizobial infection and in oxygen control resulting in non-functional nodules but did not appear to induce oxidative damage.

Interestingly, following analysis of anti-RGII antigens, we found that not only the pectin polysaccharide RGII but also at least three membrane glycoproteins were recognized by this antiserum. These “RGII-glycoproteins” were developmentally regulated in *Pisum sativum* nodules, and were never detected by the antibody in B-deficient nodules. They appeared related with development processes involving extensive membrane synthesis, like symbiosome maturation or cell growth. Several processes of secretion and signalling during cell cycle regulation fails in B-deficient nodules without RGII-glycoproteins, leading to the development of tumour-like structures. Therefore, we suggest that, besides maintaining cell wall structure, B is both stabilizing components of the membrane glycocalyx and promoting interactions between cell surfaces glycoconjugates that are important during the establishment of the symbiosis and during nodule development.

These results together with reports of abnormal tissue differentiation (Lovatt, 1985) and embryogenesis (as described in *Larix* by Behrendt & Zoglauer, 1996) under boron deficiency alongwith increasing evidence for B essentiality in animal embryo development (Rowe & Eckhert, 1999; Lanoue *et al.*, 2000), support that B is required at initial phases of cell differentiation and organogenesis, and we hypothesized that B is playing a role involving stability of glycans also during animal embryogenesis and development. Therefore, we have designed some preliminary experiments to test the effect of B-deficiency on Zebrafish embryogenesis and organogenesis. It can be considered a good biological model to study the role of B in animals, addition to their characteristics, because the results showed that the nutrient was especially required at certain stages of the process. Particularly, during early embryogenesis the cleavage (causing a 85% of B-deficient embryos developed into an amorphous cell mass) and blastula periods were highly sensitive to B deficiency as well as the moments prior to the organogenesis process of larval fins, jaws, and sensory organs, which occur between 60-70 hours post-fertilization, and that also coincides with an intense synthesis of membrane glycans (Laughlin *et al.* 2008). This supports that the involvement of B in animal organogenesis can also be related to glycan stability. B-deficiency at other stages of development, from gastrulation to hatching, did not have any visible alteration of embryo development.

Therefore, we postulate that, beyond cell wall stability, the main role of B in plant or animal development could be related with glycans involved in cell signalling during embryogenesis and/or organogenesis.





# ABREVIATURAS

8-QBA- 8-quinolinborónico

ABA- Ácido abscísico

ADP- Adenosín difosfato

ADPRc- ADP Ribosa cíclica

AGPE- Arabinogalactan protein extensin (extensina rica en arabinogalactano)

AI2- Autoinductor 2

AMP- Adenosín monofosfato

AMPc- Adenosín monofosfato cíclico

Ap<sub>n</sub>A- Diadenosin polifosfatasas

APX- Ascorbato peroxidasa

ATP- Adenosín trifosfafo

B- Boro, ácido bórico o borato, indistintamente.

DAO- Diamin oxidasa

dRGII- Dímero del ramnogalacturonano II

DTT- Ditiotreitól

EDTA- Ácido etilendiaminotetraacético

EPS- Exopolisacárido

FITC-B- Fluoresceína-5- isotiocianato conjugada con ácido borónico

fpb- Fluido peribacteroideo

GC- Glucanos cíclicos

GPMc- Guanosínmonofosfato cíclico

HRGPs- Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina



IAA- Ácido indol acético

IMP- Inmunoprecipitación

IP3- Fosfoinositol

KPS- Polisacárido capsular

Lb- Leghemoglobina

LPS- Lipopolisacárido

MALDI-TOF- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight

MAPK- Mitogen-activated protein kinases (proteínas tipo kinasas activadas por mitógenos)

MDA- Malondialdehído

mpb- Membrana peribacteroidea

NAD<sup>+</sup>- Dinucleótido de nicotinamida adenina

O/N- Over Night

POD- Peroxidasa

PRs- Pathogenesis-related proteins (proteínas relacionadas con patogénesis)

PVPP- Polivinilpirrolidona

RGII- Ramnogalacturonano II

ROS- Especies reactivas de oxígeno

SAM- S-adenosilmetionina

SDS- Dodecilsulfato sódico

SOD- Superóxido dismutasa

TEMED- N,N,N',N'-tetrametilendiamina



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>El boro y su papel en los seres vivos</b>	3
<b>Ligandos de boro. Problemática en su detección</b>	20
<b>Modelos biológicos de desarrollo dependientes de B</b>	24
La simbiosis rizobio-leguminosa como modelo para el estudio del papel esencial del B	25
Desarrollo de la simbiosis leguminosa-rizobio	26
<i>Etapas inicial de desarrollo del nódulo o preinfección</i>	31
<i>Etapas infecciosa</i>	38
<i>Desarrollo del canal de infección e invasión celular</i>	41
<i>Maduración del nódulo</i>	54
<i>Senescencia del nódulo</i>	58
La simbiosis como modelo para el estudio de la funcionalidad del boro	61
<b>Pez cebra como modelo para el estudio de la funcionalidad del boro en animales</b>	70
Desarrollo del pez cebra	72
El papel B en el desarrollo del pez cebra	75
 <b>OBJETIVOS</b>	 77
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	 81
<b>MATERIALES</b>	83
<b>Material biológico</b>	83
Plantas	83
Cepas bacterianas	84
Anticuerpos	84
Oligonucleótidos	86
Pez Cebra	87
<b>Medios de cultivo</b>	87
Medios de cultivos para plantas	87
Medios para bacterias	88
Medios sin B	89
Medio para Pez Cebra	89



<b>Reactivos y antibióticos</b> .....	90
<b>MÉTODOS</b> .....	91
<b>Esterilización de las semillas</b> .....	91
<b>Germinación de las semillas</b> .....	91
<b>Desarrollo de las plantas</b> .....	92
<b>Cultivo de las bacterias</b> .....	93
<b>Inoculación</b> .....	93
<b>Crecimiento de las plantas</b> .....	93
<b>Recogida de material biológico de origen vegetal</b> .....	94
<b>Obtención de los extractos de nódulos</b> .....	94
Fraccionamiento de nódulos .....	94
<b>Cuantificación de proteínas</b> .....	96
<b>Captación de posibles ligandos de Boro mediante captura con Amberlita IRA-743</b> .....	96
<b>Inmunoprecipitación</b> .....	97
<b>Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)</b> ...	98
Preparación de las muestras para electroforesis .....	98
Electroforesis en geles de poliacrilamida–SDS .....	99
<b>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes</b> .....	100
<b>Tinción de geles</b> .....	101
Tinción con Coomassie .....	101
Tinción con plata .....	101
<b>Electrotransferencia y detección inmunológica</b> .....	102
<b>Reutilización de la membrana de nitrocelulosa (stripping)</b> .....	102
<b>Revelado de las inmunodetecciones</b> .....	103
<b>Electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida</b> .....	103
<i>Precipitación de proteínas</i> .....	103
<i>Rehidratación de la muestra proteica y de la tira o “strip”</i> .....	104
<i>Primera dimensión</i> .....	104
<i>Segunda dimensión</i> .....	105
<b>Espectrometría de masas MALDI-TOF</b> .....	106
<b>Tratamiento con proteinasa K</b> .....	107
<b>Oxidación con periodato</b> .....	108
<b>Identificación de actividad enzimática de ascorbato peroxidada (APX)</b> .....	108
<i>Revelado de la actividad APX</i> .....	109





<b>Peroxidación de lípidos: colorimetría de malondialdehído (MDA)</b> .....	109
<b>Valoración del daño oxidativo a proteínas</b> .....	110
<b>Análisis de transcripcional</b> .....	111
<i>Extracción de ARN con TRIzol</i> .....	111
<i>Cuantificación y purificación del ARN</i> .....	112
<i>RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)</i> .....	112
<b>Tissue Print</b> .....	114
<b>Microscopía</b> .....	114
<b><i>Fijación, deshidratación e inclusión de nódulos</i></b> .....	114
<i>Fijación</i> .....	114
<i>Deshidratación</i> .....	115
<i>Inclusión LRWhite</i> .....	115
<i>Inclusión EPON 812</i> .....	116
<b><i>Estudio histológico y ultraestructural</i></b> .....	116
<i>Inmunohistoquímicas</i> .....	117
<i>Inmunocitoquímicas</i> .....	118
<b>Experimentos con pez cebra</b> .....	120
<i>Crecimiento de embriones</i> .....	120
<i>Tratamientos de deficiencia de B</i> .....	120
<i>Identificación de proteínas</i> .....	120
<i>Fotografías en lupa</i> .....	121
 <b>RESULTADOS</b> .....	 123
<b>Captación e identificación de posibles ligandos de boro en nódulos</b> .....	125
Captación de posibles ligandos mediante el uso de una resina específica de unión a borato .....	128
Identificación de posibles ligandos de B .....	130
<b>Identificación de proteínas inducidas por la deficiencia de B en nódulos</b> .....	133
<b>Inhibición de la infección e inducción de respuestas de defensa</b>	
<b>en la rizobio-leguminosa en deficiencia de B</b> .....	138
Inhibición de la infección por efecto de la deficiencia de B	
sobre las propiedades de la glicoproteína AGPE secretada al canal de infección .....	138
Inducción de proteínas relacionadas con patogénesis.....	145
<b>Alteración de los mecanismos de control de la difusión de oxígeno</b> .....	151



Localización de polisacáridos y glicoproteínas asociados a Amberlita implicados en el funcionamiento de la barrera de difusión de oxígeno.....	152
Efecto de la deficiencia de B sobre la estabilidad de la leghemoglobina .....	154
Incidencia de la deficiencia de B sobre el daño oxidativo en nódulos .....	155
<b>Efectos del B sobre procesos de diferenciación celular y organogénesis.....</b>	<b>158</b>
Efecto de la deficiencia de B sobre la organogénesis vegetal .....	158
Estudio de antígenos reconocidos por anti-RGII asociados a membranas y su relación con el tráfico y fusión de vesículas .....	160
<b>Extensión del papel del B a procesos de organogénesis animal (<i>Danio rerio</i>) .....</b>	<b>166</b>
 <b>DISCUSIÓN .....</b>	 <b>171</b>
 <b>CONCLUSIONES .....</b>	 <b>209</b>
 <i>Conclusions</i> .....	 215
 <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>221</b>



# ***INTRODUCCIÓN***

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. El boro y su papel en los seres vivos

Entre el 90 y el 95% del peso seco de la planta está constituido por tres elementos: carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H), mientras que el 5-10% restante lo constituye la denominada fracción mineral de la planta donde se incluyen elementos como el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mb), boro (B), cloro (Cl) y níquel (Ni).

Estos 17 elementos conforman el grupo de nutrientes esenciales de las plantas en tanto en cuanto son imprescindibles para la consecución de su ciclo vital. De acuerdo a las proporciones que de cada uno son requeridas por la planta, se pueden subdividir en dos grupos: macronutrientes, entre los que se encontrarían el C, H, N, O, P y S, y que constituyen aproximadamente el 99% del tejido vivo de la planta, y los micronutrientes, entre los que se incluirían los 11 elementos restantes y cuyas funciones, pese a las mínimas concentraciones en que son necesarios, son imprescindibles en la regulación de distintos procesos vitales.

Dentro de los nutrientes de plantas, elementos como el C, H, N, O, P, S, Fe, Cu, Co, Zn, Mg o Mn, son esenciales para todo el conjunto de seres vivos, otros, debido posiblemente a la problemática que conlleva su determinación analítica, sólo se han demostrado esenciales para ciertos grupos de organismos, como ocurre con el B, cuya esencialidad ha sido descrita en plantas superiores (Warington 1923), diatomeas (Lewin, 1966), cianobacterias con heterocistos (Bonilla y col., 1990) y bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> del género *Frankia* (Bolaños y col., 2002), aunque en los últimos años, multitud de estudios le han involucrado en procesos vitales en animales (Fort y col., 1999; Eckert y Rowe, 1999; Nielsen, 1997).

El primer grupo de organismos donde se describió la presencia de B fue precisamente en plantas a principios del siglo XX, en los estudios realizados por Agulhon (1910), pero el verdadero establecimiento del B como nutriente esencial en plantas a partir de los ensayos con leguminosas, fue establecido a comienzos de los años 1920 por Warington (1923). Desde entonces son muchos los estudios que han ido encaminados a determinar la función primaria que desempeña este nutriente en plantas y su posible esencialidad en otros organismos, lo que se detallará más adelante no sin antes aludir a sus características como nutriente mineral.

En este sentido, el conocimiento del papel que juega el B junto con el del resto de nutrientes en el desarrollo de los seres vivos, y en particular en las plantas, así como las relaciones que éstos mantienen entre sí, de acuerdo con las condiciones edafo-climáticas dadas, en la dinámica de la rizosfera y en las interacciones simbióticas o patogénicas que se establecen en ella, resultan de especial importancia para entender las necesidades reales de los cultivos, y todo en base a minimizar las pérdidas de productividad por malas prácticas agrícolas.

Si bien el CO<sub>2</sub> atmosférico y el H<sub>2</sub>O del suelo, aportan el C, H y O requerido por la planta, el resto de nutrientes no solo han de estar presentes en el suelo, sino que además han de estar en formas que puedan ser utilizadas por ella, es decir, se han de encontrar en su forma biodisponible.

De manera generalizada se puede afirmar que la disponibilidad de nitrógeno en el suelo es uno de los factores limitantes más importantes y determinantes en la producción agrícola actual pero, pese a su importancia agronómica, no es el único nutriente limitante en los cultivos mundiales. La aplicación de boro (B) en diversos cultivos a nivel mundial y la respuesta positiva a su adición, demuestran que existen zonas donde este micronutriente actúa como limitante (Shorrocks, 1997).

Las principales áreas a destacar en las que se puede encontrar una deficiencia de B en cultivos, están repartidas principalmente por zonas de China, Estados Unidos, Brasil y sudeste de Asia. En todo caso, la deficiencia de B va a quedar restringida a un tipo específico de suelos y de cultivos, y va a depender de un conjunto diverso de factores que se detallarán a continuación. En general su contenido en suelos va a ser bajo, y de



éste, el contenido biodisponible para las plantas va a ser aproximadamente del 10% (Power y Woods, 1997).

Por otro lado, es importante destacar que el rango entre la deficiencia y la toxicidad de este nutriente es muy estrecho, y dependiendo de la especie vegetal, los requerimientos de B en plantas están comprendidos en un rango de 10 a 100 ppm (mg/kg), de aquí la importancia del control en su adición al medio.

Con todo, para comprender el papel que juega el B, de forma general, en los seres vivos, se han de analizar sus características químicas, que serán determinantes de su funcionalidad.

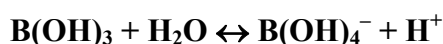
Se ha de tener en cuenta que el B, de número atómico 5, es un semimetal o metaloide, con características intermedias entre los metales y los no metales. Constituye el elemento de mayor diversidad química (Greenwood y Earnshaw, 1984), por detrás del carbono, gracias a su particular disposición electrónica con tres electrones de valencia, con los que establece enlaces de características especiales formando compuestos, muchos de los cuales, poseen un déficit electrónico. Tal es el caso de su asociación con el hidrógeno formando boranos (compuestos de síntesis), con los que establece un triple enlace covalente, quedando carente del par de electrones que completaría su orbital (Power y Woods, 1997).

En la naturaleza, el boro se suele encontrar mayoritariamente asociado al oxígeno formando boratos, que suelen formar parte de depósitos evaporíticos, dando lugar a formaciones minerales de bórax (borato de sodio,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) y, en menor proporción, de colemanita (borato de calcio,  $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). El boro, aunque en menor proporción, también precipita como ácido bórico  $\text{B}(\text{OH})_3$ , formando el mineral conocido como sassolita, asociado a actividad volcánica. Por otro lado, se pueden encontrar menas de boro naturales en depósitos de pegmatitas, rocas formadas a partir de la solidificación de magmas silicatados y, en raras ocasiones, se encuentra unido al flúor formando el  $\text{BF}_4^-$ .

El boro posee dos isótopos estables de masa 10 (19,9%) y 11 (80,1%), respectivamente. Su estado de oxidación más habitual es +3, pero, dado el elevado requerimiento

energético, no se encuentra en estado iónico en solución, lo que explica su carácter covalente.

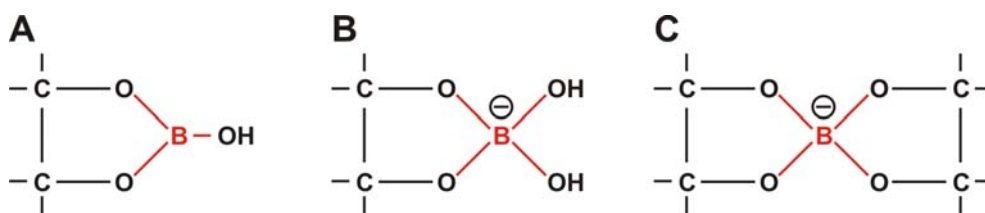
El ácido bórico  $B(OH)_3$  en solución acuosa, se comporta como un ácido de Lewis débil ( $K_a = 6 \times 10^{-10}$ ,  $pK_a = 9.25$ ) según la siguiente ecuación:



Esta ecuación revela que a bajas concentraciones ( $\leq 0,02$  M), únicamente estarán presentes las dos formas mononucleares del B, es decir,  $B(OH)_3$  y  $B(OH)_4^-$ , mientras que, a altas concentraciones o bien por incremento del pH, comienzan a surgir iones polinucleares como el anión bórax ( $B_4O_5(OH)^{2-}_4$ ). En cualquier caso, a pH fisiológico, entorno a 7,5, el equilibrio de la reacción está desplazado hacia el  $B(OH)_3$  en un 98%, el cual puede establecer enlaces éster con alcoholes de acuerdo con la siguiente ecuación:



En ésta, el equilibrio está desplazado hacia los productos y va explicar la capacidad que tiene el B de actuar como molécula de anclaje entre moléculas hidroxiladas como polisacáridos, dioles e hidroxiaácidos, presentes en estructuras biológicas, de acuerdo a las interacciones presentes en la figura 1.



**Figura 1.** Modelos esquemáticos de las distintas interacciones del ácido bórico con grupos *cis*-diol (A) éster *cis*-diol monoborato; (B) complejo monoborato y (C) complejo bis(diol) borato. *Extraído de Power y Woods, 1997*

Dentro de estas interacciones, y de acuerdo con lo establecido por Mazurek y Perlin (1963), los ésteres de borato más estables son los que mantienen enlaces *cis*-diol con un anillo de furano, cuya estructura presenta analogía con la denominada furanosa. Así, en componentes de los seres vivos, únicamente la apiosa y la ribosa cumplen estas

características, y precisamente, la apiosa forma parte de uno de los componentes de la fracción pectínica de la pared, el ramnogalacturonano II (RG-II), que se encuentra formando dímeros gracias a la acción del B como elemento de anclaje entre las dos cadenas de RG-II a través de los residuos de apiosa (Kobashy y col., 1996; O'Neill y col, 1996), lo que constituye hasta ahora la única función primaria demostrada del B en eucariotas.

El B, cuyas necesidades en plantas son del orden  $\mu\text{M}$ , es absorbido por las plantas como  $\text{B(OH)}_3$  (Hu y Brown, 1997) y su biodisponibilidad, como se ha comentado, va a ser dependiente de varios factores, que se detallarán a continuación (Golberg, 1997):

- El *pH del suelo*. A medida que se incrementa el pH, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la forma aniónica,  $\text{B(OH)}_4^-$ , que además de no ser disponible para la planta, puede ser retenida por fenómenos de adsorción en los distintos materiales edáficos, favoreciendo la inmovilización del nutriente en el suelo. Este fenómeno de adsorción y desorción en los suelos va a ser dependiente de otro de los factores, la textura.
- La *textura* del suelo es un factor clave en la biodisponibilidad del nutriente. El tipo de constituyentes del suelo, fundamentalmente arcillas, óxidos y materia orgánica, van a ejercer una acción retentiva que puede dificultar la disponibilidad del nutriente al adsorberlo fuertemente, aunque al mismo tiempo, esta retención podría evitar la pérdida del micronutriente por lixiviación, de acuerdo al equilibrio establecido con el resto de factores. Por ejemplo, en suelos ricos en materia orgánica, la formación de coloides que contienen B puede favorecer la disponibilidad del mismo, por el contrario, en suelos arcillosos, la retención del ácido bórico reduce su disponibilidad para la planta.
- La *humedad* va a ser otro condicionante de la biodisponibilidad del B. En general, en suelos donde la humedad es baja, existen problemas de disponibilidad al verse afectado el transporte del ácido bórico hacia el interior de la planta. Por otro lado, la existencia de condiciones climáticas con abundantes precipitaciones, pueden provocar la lixiviación del ácido bórico, con alta solubilidad, y consiguientemente, la pérdida del nutriente.
- La *temperatura* y su efecto sobre la disponibilidad del nutriente va a depender del tipo de suelo, que va a condicionar la adsorción del micronutriente. Se ha

establecido que en suelos cristalinos el descenso de temperatura favorece la adsorción del ácido bórico, mientras que en suelos amorfos, será el aumento de temperatura el que provoque el incremento de su adsorción. Existen trabajos que apuntan a que los máximos valores de fitoacumulación del B se dan a una temperatura de 27°C de acuerdo con las condiciones de estudio dadas (Baghour y col., 2002), que difícilmente pueden ser generalizadas.

- Otro de los factores a considerar a la hora de analizar la biodisponibilidad del B en el suelo, es el efecto que produce la *presencia de otros nutrientes*. Además de las interacciones físico-químicas que se puedan establecer y que pueden condicionar su disponibilidad, un punto clave a considerar es la proporción entre los nutrientes existentes en el sistema edáfico, pues la existencia de concentraciones elevadas de N, Ca, o P, que suele ir pareja a la adición de fertilizantes, puede convertir al B en limitante del crecimiento de la planta.

En cualquier caso, además de los factores comentados, hay que tener en cuenta que no todas las plantas tienen las mismas necesidades de B, y por tanto, no todas muestran la misma sensibilidad a su deficiencia, por lo que, concentraciones de B que para algunas pueden resultar tóxicas, no lo son para otras, de aquí que, de acuerdo a sus requerimientos de B, se puedan clasificar en tres grupos (Goldach, 1997):

- Plantas con bajos requerimientos de boro: gramíneas. En ellas, es complicado reproducir condiciones de deficiencia de B. El contenido de B en hoja está comprendido entre 2 y 5 µg/g
- Plantas con necesidades intermedias de B: resto de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Su contenido de B en hoja comprende el intervalo de 20 a 80 µg/g.
- Plantas con necesidades elevadas de B: como las plantas productoras de látex. Su contenido de B en hoja supera los 80 µg/g.

En este sentido, es interesante relacionar el control genético que se ejerce en el transporte de dicho elemento, que estará directamente relacionado con la posible reducción de la problemática que su deficiencia y toxicidad generan en las plantas. El boro es absorbido por influjo hídrico a través de las raíces y es transportado por el xilema. A nivel floemático el B presenta una reducida movilidad (Oertli y col., 1970).

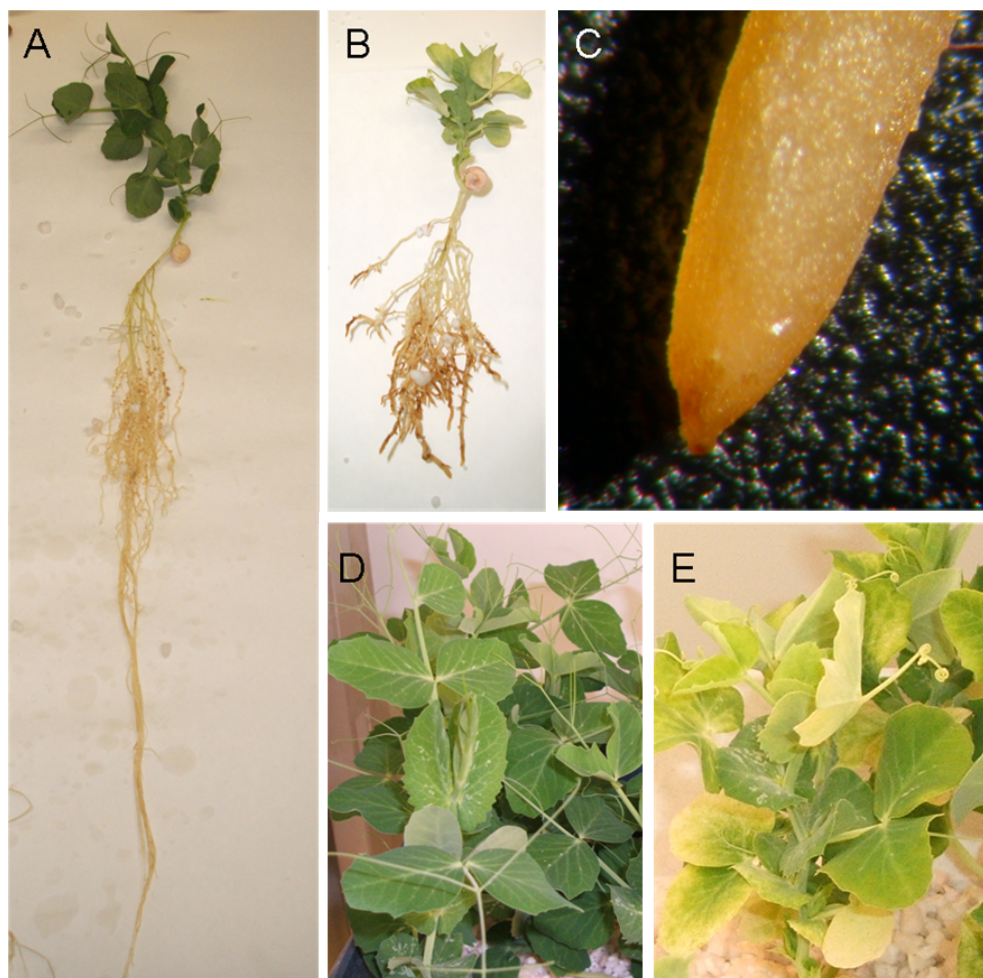
Además del transporte pasivo a través de membrana que acontece ante altos niveles de ácido bórico en el medio (Raven, 1980), recientemente se han identificado, en *Arabidopsis thaliana*, dos canales de ácido bórico (NIP5;1 y NIP6;1) que divergen en su permeabilidad al agua, y una proteína exportadora de bórico/borato (BOR1), todas ellas necesarias para el crecimiento de la planta en condiciones limitantes de B (Takano y col., 2002; Takano 2006; Tanaka y col., 2008). Además, BOR1, que se encarga de introducir el ácido bórico al xilema, presenta homología con proteínas de mamíferos que parecen participar en la homeostasis del B y también en la tolerancia a la toxicidad del B en levadura y plantas (Takano y col., 2008). En el caso de mutantes de *A. thaliana* en el gen *bor1-1*, se observó tanto la inhibición en el crecimiento del tallo, como una reducción en la fertilidad (Noguchi y col., 1997) así como un fallo en la translocación del B de la raíz al tallo (Noguchi y col., 2000). Por el contrario, la sobre-expresión del gen, resultó en una mejora tanto del crecimiento como de la fertilidad en condiciones de deficiencia de B (Miwa y col., 2006). La proteína NIP5;1, que se encarga de introducir el ácido bórico a la planta a través de la raíz, pertenece a la familia de proteínas intrínsecas o MIP (Major Intrinsic Protein), que suelen formar canales para el paso de agua o pequeñas moléculas sin carga (Wallace y col., 2006). En ella se incluyen varias subfamilias, como la de las proteínas intrínsecas tipo nodulina 26 (nodulin 26-like intrinsic proteins, en inglés) (NIPs), en la que se incluye NIP5;1. Los transcritos de esta proteína aumentan bajo deficiencia de B y mutantes en *NIP5;1*, muestran una drástica reducción en el crecimiento de tallo y raíces, y su sobre-expresión, a diferencia de lo que ocurre con *bor1*, resultó en una mejora del crecimiento de la raíz y de la incorporación del B a la planta, haciéndola más tolerante a condiciones limitantes del nutriente (Kato y col., 2009). En el caso de NIP6;1, de características similares a NIP5;1, forma un canal que facilita el paso del ácido bórico a través de membrana, siendo impermeable al agua, y su expresión se ha visto inducida en condiciones deficientes de B en la zona del tallo circundante al floema, por lo que se ha propuesto como determinante del transporte del ácido bórico al tallo, y más concretamente de la transferencia de éste del xilema al floema (Tanaka y col., 2008). Con todo, el aumento en la expresión de estos sistemas de transporte parece incidir positivamente en un aumento en la tolerancia a la deficiencia (Kato y col., 2009).

Siguiendo en la tesitura del transporte de B, además de las ventajas que puede generar la modificación genética de transportadores en el incremento de la tolerancia a los

distintos niveles de concentración del nutriente, existen otros trabajos, concretamente en tabaco (*Nicotiana tabacum*) que se basan precisamente en la movilidad floemática del B mediante su complejación por interacción con azúcares con grupos alcohol, como el sorbitol, que serían utilizados como transportadores del B hacia los tejidos subyacentes desde los tejidos maduros (Hu y col., 1997). En dichos trabajos, se obtuvieron plantas sobre-productoras de sorbitol, promoviendo la sobre-expresión del gen *S6PDH*, resultando en un incremento de la movilidad del B así como un incremento de la tolerancia a condiciones limitantes de B (Brown y col., 1999).

Cuando existe deficiencia de B en la planta, se van a producir una serie de efectos a nivel fenotípico, característicos y reconocibles a simple vista, entre los que destaca la ralentización de la elongación del ápice de raíz, pareja al necrosamiento de los tejidos radiculares. Este efecto da un aspecto coralino a la raíz muy característico de la deficiencia (Fig.2 B). Además, existen un conjunto de alteraciones en la parte aérea detallados a continuación (Fig.2):

- Hojas deformadas, quebradizas y pequeñas, con síntomas de clorosis en el inicio del desarrollo y necrosis en estadios avanzados de desarrollo (Fig.2 E).
- Tallos acortados por inhibición en su crecimiento apical, quebradizos y necrosados (Fig.2 B)
- Yemas y puntos meristemáticos necróticos (Fig.2 C).
- Floración irregular y, en ocasiones, con deformaciones. Bajo condiciones de deficiencia severa, puede llegar a no existir floración.
- Fructificación irregular, con una disminución en la cantidad y calidad del fruto, consecuencia de la afección en el desarrollo del tubo polínico.



**Figura 2.** Efectos fenotípicos de la deficiencia de B en plantas de *Pisum sativum* de 3 semanas de desarrollo (A) plantas control, (B) plantas deficientes de B, (C) meristemo apical radicular necrótico en deficiencia de B, (D) hojas de plantas control y (E) hojas de plantas deficientes de B.

La deficiencia de B en plantas y otros organismos, además de los efectos a nivel fenotípico, va a producir un conjunto de efectos a nivel fisiológico, que serán detallados en la tabla que aparece a continuación. En ésta se describen un conjunto de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que, desde hace más de 60 años, se vienen asociando a la deficiencia de este nutriente. Así, aunque muchos de estos fenómenos siguen siendo analizados en la actualidad, otros muchos, como los relacionados con animales y más concretamente en humanos, han comenzado a abordarse hace no más de 10 de años. En general, y teniendo en cuenta que la deficiencia de B va a provocar una cascada de efectos en el metabolismo celular, participando en el crecimiento y desarrollo de la planta (Marschner, 1995), se puede establecer, que el papel estructural del B parece insuficiente para dar cabida al conjunto de fenómenos que su deficiencia produce.

Proceso fisiológico y bioquímico	Autores
Transporte de azúcares	Gauch y Dugger (1953) McIlrath y col. (1960)
Lignificación	McIlrath y Skok (1964) Putoczki y col. (2007)
Metabolismo de carbohidratos	Dugger y Humphreys (1980) Wainwright y col. (1980) Robertson y Loughman (1973) Lughman (1961) Lee y Aronoff (1967)
Metabolismo de ARN	Shkol'nik y Kositsyn (1962) Albert (1965) Chapman y Jackson (1974) Birnbaum y col. (1977)
Metabolismo de nitratos	Bonilla y col. (1980) Camacho-Cristóbal y González-Fontes (2007)
Respiración	Maevskaya y Alekseeva (1966)
Metabolismo de IAA	Rajaratman y Lowry (1974) Bohnsack y Albert (1977) Tang y dela Fuente (1986) Hirsch y col. (1980) Wang y col. (2006)
Metabolismo de fenoles	Lee y Aronoff (1967) Shkol'nik (1974) Liakopoulos y Karabourniotis (2005)
Síntesis de la pared celular	Wilson (1961) Dugger y Palmer (1980) O'Neill y col. (2001)
Estructura de la pared celular	Kouchi y Kumazawa (1976) Kobayashi y col. (1996)
Membranas	Tanada (1974) Pollard, Parr y Loughman (1977) Hirsch y Torrey (1980) Ferrol y col (1992; 1993)
Fijación de N <sub>2</sub>	Bonilla y col. (1990) Bolaños y col. (1994) Bolaños y col. (2002)
Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico.	Jackson (1989) Wang y col. (2003)
Control de poblaciones bacterianas ( <i>quorum sensing</i> )	Chen y col (2002)
Crecimiento y proliferación celular	Park y col. (2005) Takano y col (2006) Reguera y col. (2009)
Reproducción y desarrollo embrionario en animales (sapo africano, pez cebra, cerdo, roedores)	Eckhert y Rowe (1999) Fort y col (1999) Lanoue y col. (2000) Armstrong y col (2002)
Formación de huesos	Bai y Hunt (1996) Gorustovich y col., (2008)



Metabolismo de esteroides	Samman y col. (1998) Nielsen (2000) Park y col. (2005)
Prevención de cáncer de próstata y mama	Eckhert y col (2007) Meacham y col. (2007) Gallardo y col. (2004)

De acuerdo con los efectos fisiológicos recogidos en la tabla, se va a proceder a la descripción de algunos de ellos, con el objetivo de dejar patente los mecanismos de acción de este micronutriente en los distintos procesos fisiológicos.

Sin duda, una de las funciones más estudiadas del B en plantas es su papel como integrante de la pared celular. Ésta, como se ha dicho, constituye la única función primaria del B demostrada en eucariotas. En plantas no vasculares (Briofitas), la cantidad de RG-II constituye, aproximadamente, el 1% de la cantidad total de pectina que se encuentra en plantas vasculares. Su contenido, y consecuentemente también el de B, aumenta de acuerdo con el grado de complejidad evolutiva, lo que denota su importancia en la formación de la estructura de pared (Matsunaga y col., 2004).

La importancia del RGII en pared está relacionada, lógicamente, con su mantenimiento estructural, su turgencia, elasticidad y porosidad. El trabajo clave en la vinculación del B con la pared celular, fue el desarrollado por O'Neill y col. (2001), en el que se demostró que el ensamblaje de dímeros de RGII estaba mediado por B, concretamente por borato, gracias precisamente al enlace borato-diéster entre las dos apiosas correspondientes a cada uno de los dos monómeros de RGII. La pectina posee además, otra apiosa que no está implicada en el enlace (Reuhs y col., 2004).

Por otro lado, además del papel que juegan las apiosas en la estabilización de la pared, existen otros azúcares integrantes del RGII que participan en dicha estabilización. De hecho, en el mismo trabajo de O'Neill y col. (2001) se muestra cómo en el mutante de *Arabidopsis thaliana mur1*, aparecen reemplazados residuos de L-fucosa por L-galactosa en el RG-II, perdiendo el ensamblaje que el borato ejercía entre dichas moléculas, pudiendo ser recuperada mediante la adición de B (Reuhs y col., 2004) o por adición de fucosa (O'Neill y col., 2001). Todo ello podría traducirse en la implicación de otros azúcares en la estabilización que el B realiza en pared.

Además, las consecuencias de la alteración de la pared por deficiencia de B, también afectan al anclaje de otros componentes de la misma, como proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (Bonilla y col., 1997a), especialmente importantes en ciertos tejidos de la planta, tal y como será detallado más adelante (Bonilla y col., 1997a).

En sí, este efecto estructural de la deficiencia, explicaría alteraciones como la reducción en la elasticidad de pared (Findelee y Goldbach, 1996), la alteración en la porosidad (Fleischer y col., 1999) y en general, la desorganización de la pared celular (O'Neill y col., 2004) que se observa en dichas condiciones.

El papel del B en membrana, cubre un amplio espectro de implicaciones que van desde el funcionamiento de enzimas, al transporte o la integridad de la misma (Cakmak y Römheld, 1997; Goldbach y col., 2001; Brown y col., 2002). Por ejemplo, en deficiencia de B, el sistema enzimático Fe-reductasa parece afectado (Ferrol y Donaire, 1992). También se inhiben la actividad de la NADH-reductasa (Barr y col., 1993) y el gradiente de  $H^+$ , relacionado con una disminución de actividad de la ATPasa y con un incremento de la conductancia pasiva, que explicarían el aumento de la rigidez en membranas desarrolladas bajo condiciones de deficiencia de B (Ferrol y col., 1993). En este sentido, el efecto sobre el metabolismo de nitratos parece relacionado precisamente con la disminución de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa, necesaria para el cotransporte de nitrato hacia el interior celular, que se vería mermado en deficiencia (Camacho-Cristóbal y González-Fontes, 2007). Así mismo, los niveles de nitratos parecen acumularse por fallo en la actividad nitrato-reductasa (Bonilla y col., 1980, 1984). El B parece intervenir además en la fluidez e hidratación de la bicapa lipídica que conforma la membrana (Verstraeten y col., 2005) y en la permeabilidad del  $K^+$  y azúcares (Wang y col., 1999; Cakmak y col., 1995) así como en el incremento de los niveles de  $Ca^{2+}$  en el apoplasto (Mühling y col., 1998). Muchos de estos efectos descritos a nivel de membrana no han sido fehacientemente establecidos como efectos directos del B, de hecho, algunos, como es el caso de la afección a la permeabilidad de  $K^+$ , parecen en mayor medida consecuencia de un efecto secundario de la deficiencia (Goldbach, 1997). En cualquier caso, las alteraciones que ocurren a nivel de membrana tanto a corto como a largo plazo, demuestran que su estabilidad es dependiente de la presencia del micronutriente.

Precisamente, el conjunto de alteraciones observadas en membrana y el hecho de que el B pueda interaccionar con grupos *cis*-diol de componentes de la misma, como se detallará en el siguiente apartado, daría sentido al modelo propuesto por Goldbach (1997), donde se establece que el B interaccionaría con componentes de membrana tanto de vesículas provenientes del Golgi como de la membrana plasmática, pudiendo intervenir en la fusión vesicular y en la liberación y estabilización de constituyentes de pared. Así, en condiciones de deficiencia de B se produciría un fallo en el transporte y en la estabilidad del mecanismo de fusión vesicular, con la consiguiente acumulación del material en el citoplasma.

Se ha de tener en cuenta que todos los efectos descritos en membranas, bien debido a la acción directa o indirecta del micronutriente como se ha comentado, apuntan a una posible interacción del B con componentes glicoproteicos o glicolipídicos, como papel primario y fundamental del mismo, lo cual además daría sentido al hecho de que en células animales, carentes de pared, cada vez se estén descubriendo más efectos negativos de la deficiencia de B.

En cuanto al comentado efecto del cese del crecimiento meristemático bajo deficiencia de B, podría estar relacionado con el metabolismo del ácido indol acético (IAA), representante más generalizado de las auxinas, y son varios los trabajos que han realizado aportaciones en el conocimiento del papel del B en su metabolismo y transporte, no sin revelar las numerosas contradicciones existentes. Dada la similitud de algunos de los cambios morfológicos que se producen bajo deficiencia de B con los producidos por el incremento en IAA, muchos autores han propuesto la existencia de un aumento de los niveles endógenos del ácido en zonas apicales por inactivación de la enzima IAA oxidasa (Coke y Whittington, 1968; Jaweed y Scott, 1967), debido a la concentración de fenoles que acontecería bajo deficiencia de B como consecuencia de la activación del sistema enzimático fenilalanina amonio liasa (PAL) (Shkol'nik, 1974; Ruiz y col., 1998). Sin embargo, otros muchos autores abogan por la pérdida de este componente en condiciones deficientes (Li y col., 2001) o, tal y como se recoge en el trabajo de Hirsch y col. (1980), se establece que no existen diferencias en los niveles endógenos de IAA bajo deficiencia. También queda patente la discrepancia en la determinación de la actividad de la enzima IAA oxidasa, puesto que algunos autores defienden su inducción en condiciones deficientes (Bohnsack y Albert, 1977) mientras

que otros defienden su inactivación (Coke y Whittington, 1968). Se ha de tener en cuenta que la falta de unanimidad en cuanto a resultados obtenidos probablemente esté relacionada con las diferencias que se encuentran en los procesos de regulación entre distintas especies, o entre la sensibilidad de los distintos tejidos vegetales e incluso, por influencia del diferente estado de deficiencia que haya alcanzado la planta.

Otro de los aspectos relacionados con el metabolismo del IAA estudiado bajo deficiencia de B, ha sido su transporte. Tang y de la Fuente (1986) determinaron el efecto sinérgico que el B y el Ca ejercían en el transporte polar del IAA. Mencionar que, en estudios recientes, se ha determinado la reducción del transporte del IAA desde el tallo, lo que explicaría la reducción del crecimiento y de la dominancia apical (Li y col., 2001; Wang y col., 2006). Un efecto sobre los transportadores de auxinas relacionaría también al B con el funcionamiento de la membrana celular, pero en cualquier caso, no existen suficientes evidencias aún para establecer de qué manera concreta influye el B en el proceso de transporte del IAA.

También es importante destacar la afección de la deficiencia de B en la regulación de los niveles de otras hormonas como las citoquininas, así como en la regulación de los ratios entre ellas, que en muchas ocasiones condicionan los distintos procesos celulares en mayor medida que la presencia independiente de cada una de ellas (Shimizu-Sato y Mori, 2001). Tal es el caso de la relación auxina/citoquinina, que está implicada en la regulación del ciclo celular al incidir sobre la expresión de las ciclinas (cyc) y sobre las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) (Stals H. y col., 2000), de las que se hablará más adelante.

Los efectos descritos de manera generalizada en membrana pueden ser extensibles a otros sistemas de membranas integrantes de orgánulos celulares, como los cloroplastos. La implicación del B en fotosíntesis se ha descrito en varios trabajos en los que se hace alusión a su efecto en el daño oxidativo a tilaoides, a la disminución de ácidos grasos en los mismos y a una inhibición en la transferencia de electrones junto con un declive en la actividad del fotosistema 2 (El-Shintinawy, 1999), pero ninguno de ellos determina la función primaria del B en el proceso, e incluso todos ellos podrían ser achacables a un efecto secundario de la deficiencia al verse inhibidos el crecimiento de raíz y tallo (Goldbach y Wimmer, 2007). Sí es interesante destacar que el contenido de B en

cloroplastos se ha demostrado elevado (Bussler y Döring, 1979), lo que podría estar relacionado con su asociación a glicolípidos y glicoproteínas, potencialmente susceptibles de interaccionar con B. Uno de los trabajos recientes relativos al B y su afección al proceso fotosintético (Han y col., 2008), describe, en hojas de naranja tratadas bajo deficiencia de B, la existencia de una reducción en la asimilación de carbono junto con una incremento de glucosa, fructosa y almidón, que podría vincularse al efecto del aumento de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato en deficiencia, recogido en la tabla anterior (Shkol'nik y Ilyinskaya, 1975), y consiguientemente, el aumento en la actividad del ciclo, explicaría además la acumulación de polifenoles bajo dichas condiciones (Lee y Aronoff, 1967; Cakmak y Römheld, 1997).

La otra función primaria del B de la que se tiene constancia demostrada, es su presencia en el complejo AI2 o autoinductor 2, que constituye una molécula señal en el proceso de comunicación bacteriana *quorum sensing*, mediante el cual, las bacterias llevan a cabo una regulación conjunta y coordinada de la expresión de genes, que resulta de vital importancia para su supervivencia en rizosfera y en fenómenos de interacción con otros organismos (fenómenos de interacción simbiótica o patogénica). Este autoinductor, a diferencia de otros que son característicos de la estirpe bacteriana, parece común a diversas especies microbianas y se ha propuesto como señal de comunicación entre especies (Chen y col., 2002). Es sintetizado por las bacterias a partir del compuesto S-adenosilmetionina, que de por sí puede formar complejos estables *in vitro* con el B a alto pH (Hunt, 2002), y para su activación parece imprescindible la unión con furanosil diéster borato (Chen y col., 2002).

Aunque se detallará en un apartado posterior, de acuerdo a lo señalado en la tabla, el B parece no solo esencial en plantas, sino que su implicación parece ir más allá, afectando a distintos procesos vitales de animales. Además del efecto de la deficiencia de B en el desarrollo embrionario del *Danio rerio* (Zebrafish, en inglés) (Eckhert y Rowe, 1999) y otros animales como en *Xenopus laevis* (Fort y col., 1999), numerosos estudios nutricionales avalan los beneficios que el B aporta a la dieta (Hunt, 2002; Nielsen, 1997), entre los que destaca el papel que juega en la formación ósea (Gorustovich y col., 2008), bien por su implicación en la síntesis de vitamina D (Samman y col., 1998; Bai y Hunt, 1996; Hegsted y col., 1991), por su efecto sobre la absorción y retención del calcio (Hunt, 1998) o de lípidos (Armstrong y col., 2000).

Como se ha comentado anteriormente, algunos de los transportadores descritos para el B en plantas presentan homología en mamíferos, concretamente BOR1 con NaBC1 (antes llamado BTR1), que funciona como un transportador de  $\text{Na}^+$ -borato ( $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ). Éste parece esencial en el crecimiento y proliferación celular, pues, como demuestra el trabajo de Park y col. (2005), bajas concentraciones de B, en cultivos celulares animales, parecen tener efecto mitogénicos, mediados por la vía MAPK (del inglés, *Mitogen-activated protein kinases*), una ruta de transducción de señales en células eucariotas. Así mismo, parece que el nivel en la expresión de este transportador, cuyo bloqueo también parece provocar un cese del desarrollo y proliferación celular (Park y col., 2004), podría dar explicación al efecto del B en líneas celulares cancerígenas de próstata o de mama, donde parece que la adición de B inhibe la proliferación celular (Meacham y col., 2007).

Así pues, una de las implicaciones más recientes y que, dada su importancia, es de especial interés, es la implicación del B en la prevención del cáncer. Entre otros efectos, parece que el aporte de B incide en la expresión de un factor tumoral del adenocarcinoma en el cáncer de próstata (Gallardo y col., 2004), y la adición de ácido bórico mejora la acción inhibitoria de agentes preventivos tumorales como la selenometionina y la genisteina (Barranco y col., 2006). Además, aunque se hablará de ello más adelante, dentro de los ligandos reconocidos de B está el  $\text{NAD}^+$  (Ralston y Hunt, 2001), y en los trabajos de Eckhert y col. (2007) y Barranco y col. (2008), se describe cómo gracias a la unión del ácido bórico con  $\text{NAD}^+$ , que constituye un coenzima metabólica y actúa a la vez de sustrato para la ciclase ADP-Ribosa, se inhibe su actividad reduciéndose la formación de ADP-Ribosa cíclica. La ADP-Ribosa cíclica (ADPRc) es una molécula señal que promueve la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno, del retículo al citoplasma. Estos autores demuestran que la inhibición de la ciclase ADP-Ribosa por la formación del complejo B- $\text{NAD}^+$ , conduce a una inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y a una reducción de la proliferación celular en cáncer de próstata. En plantas, la ADPRc ejerce de mediador en las respuestas a ácido abscísico (ABA) (Grill y Himmelbach, 1998), hormona implicada en señalización bajo distintos estreses, pero también en procesos del desarrollo vegetal, mientras que en animales, la ADPRc está involucrada en numerosas funciones fisiológicas (desarrollo embrionario, huesos, músculos...) (Lee, 2002).

Mencionar además, que gracias a sus propiedades químicas, el B está siendo actualmente empleado en una de las terapias contra el cáncer cerebral y cervical, la denominada “Boron Neutron Capture Therapy”, en inglés, o Terapia de Captura de Neutrones por Boro, cuya aplicación ofrece como principal ventaja el escaso daño a tejidos sanos por permitir radiar el tejido tumoral de forma muy localizada (Barth y col., 1996; Yamamoto y col., 2008).

Otros de los efectos en los que se ve implicado el B son el desarrollo y la formación de la estructura ocular (Eckhert y Rowe, 1999; Fort y col., 1999), función cognitiva (Penland, 1998), en la reducción de la cantidad requerida de insulina para el mantenimiento de la glucosa en plasma (Bakken y Hunt, 2003), alteraciones macrominerales o incrementos en la eliminación de calcio en orina (Devirian y Volpe, 2003), función antibiótica como componente de la boromicina de *Streptomyces* sp A-3376 con acción sobre el VIH (Kohno y col., 1996), en la mejora parcial del fallo hepático severo modulando los niveles de antioxidantes y, en sí, el estrés oxidativo (Pawa y Ali, 2006), o en el tratamiento de procesos inflamatorios (Hunt, 2000), interaccionando con las serín proteasas (Hunt 2003), también implicadas en dicho proceso.

## 2. Ligandos de boro. Problemática en su detección.

Todos los efectos analizados en relación a la deficiencia de B en plantas, bacterias y animales, muestran que es un elemento involucrado en la dinámica de diversos procesos vitales. Pese a la diversidad de alteraciones que su carestía muestra, hasta ahora, son sólo dos las funciones primarias demostradas del boro en seres vivos. Por un lado, su interacción formando enlaces diéster con las apiosas de RGII de pared celular (O'Neill y col., 2001), lo que le hace partícipe en el mantenimiento de la estructura celular, y por el otro, como integrante de la forma activa del complejo AI2 (Chen y col., 2002), autoinductor implicado en fenómenos de *quorum sensing* en bacterias.

Teniendo en cuenta que la naturaleza de la interacción entre el RGII y el AI2 con iones borato es la responsable del papel biológico de estas moléculas, parece razonable afirmar que la principal función biológica del B resida en su unión a moléculas con grupos *cis*-diol haciéndolas funcionales, independientemente del papel que dichas moléculas desempeñen, ya sea estructural como el RGII o señalizador celular como el AI2, y esto gracias a las ya descritas características químicas que este elemento posee (Bolaños y col., 2004a).

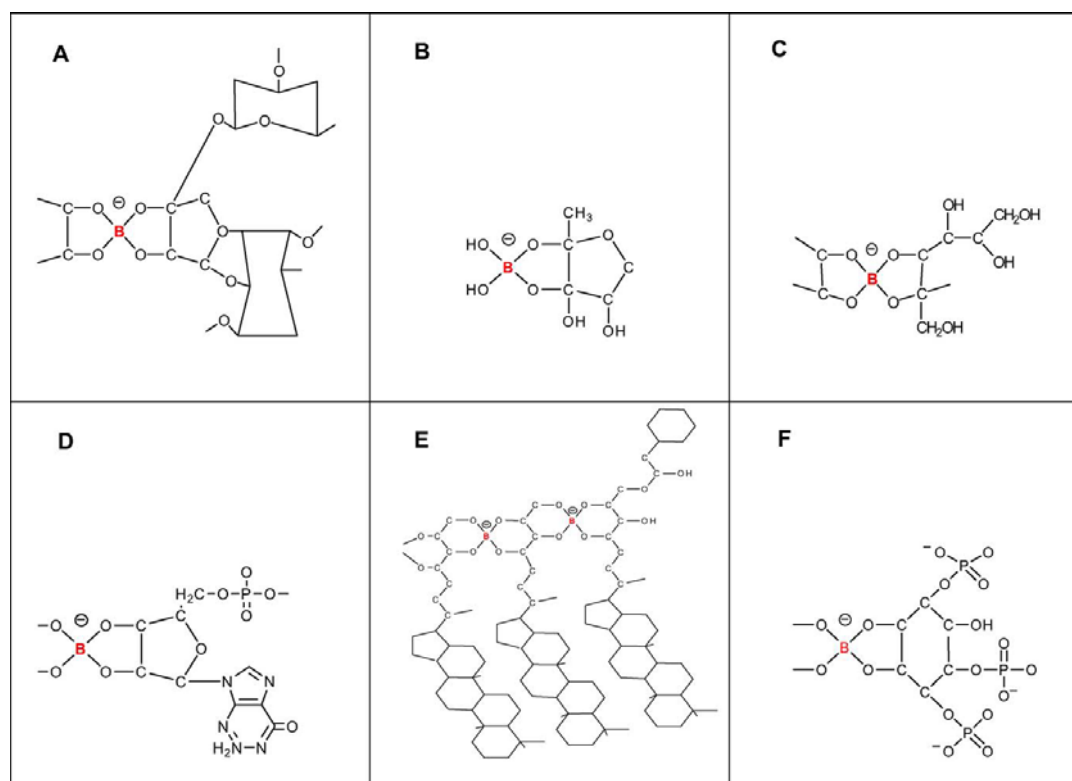
De hecho, como también se ha descrito, el efecto que la deficiencia de B ejerce en el mantenimiento de la integridad de la membrana podría estar relacionado precisamente con la unión del B a distintos constituyentes hidroxilados, como glicoproteínas o glicolípidos (Brown y col., 2002).

Por otro lado, aunque no constituye una función propiamente dicha del B, se ha demostrado la capacidad de unión del B al sorbitol y a otros componentes floemáticos como el manitol (Hu y col., 1997), lo que es determinante en el transporte del B a través del floema, que previamente se había considerado inexistente (Hu y col., 1997).

Además de su participación demostrada en la formación de estos tres componentes (RGII, AI2 y sorbitol), han sido postulados numerosos sitios de unión de B en distintas moléculas, como en el segundo mensajero, derivado del inositol, guanósínmonofosfato cíclico (GMPc), en el fosfoinositol (IP3) y en el hopanoide bacteriohopanetetrol



responsable del mantenimiento de las cubiertas de bacterias del género *Frankia* (Bolaños y col., 2004a).



**Figura 3.** Unión del B a distintos componentes biológicos: (A) a RGII de pared celular en plantas, (B) al autoinductor AI2 participe en *quorum sensing* (C) y complejación del B al sorbitol. Uniones propuestas del B: (D) al GMP, (E) al hopanoide bacteriohopanetetrol y (F) al fosfoinositol (IP3). A, B y C están experimentalmente demostrados; D, E y F son ligandos hipotéticos. *Extraído de Bolaños y col., 2004a.*

Así, dentro de los componentes de membrana susceptibles de interaccionar con B encontramos al glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferguson y Williams, 1988). Éste contiene tres residuos de manosa además del fosfatidilinositol propiamente dicho, y ambos son capaces de interaccionar con B (Ralston y Hunt, 2001). Esta interacción alteraría la accesibilidad de las fosfolipasas a la molécula de GPI, que no sería hidrolizada. Así, la presencia de B sería determinante en la estabilidad de las GPI-proteínas, proteínas como las denominadas HRGPs, ricas en hidroxiprolina, integrantes de pared, lo que explicaría el fallo en el ensamblaje de éstas en deficiencia de B, como se detallará en el siguiente apartado (Bonilla y col., 1997a; Goldbach y Wimmer, 2007).

La posibilidad de unión a los fosfoinositoles abre una posible vía de acción para el B, pues éstos pueden actuar como segundos mensajeros en transducción de señales

propiciando, en otras, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplasmático hasta el citosol (Bolaños y col., 2004a).

Por otro lado, la participación del B en la formación del  $\text{NAD}^+$  estaría vinculada a la posible unión del B a nucleótidos y nucleósidos purínicos (adenilatos y guanilatos). El estudio llevado a cabo por Ralston y Hunt (2001) determinó, *in vitro*, la unión del B a compuestos con adenosina, entre los que se incluye la S-adenosilmetionina (SAM), agente metilante que constituye una monoadenosina que participa en la formación del ya comentado autoinductor AI2. Además, a pesar de que la SAM es la monoadenosina de mayor afinidad por el B, otras monoadenosinas también presentaron capacidad de unión a B, como el  $\text{NAD}^+$  o el NADH (co-factores esenciales para actividades enzimáticas), el ATP, el ADP, el AMP y el  $\text{AMP}_c$ . También las di-adenosin polifosfatasas ( $\text{Ap}_n\text{A}$ ), involucradas en proliferación celular o respuestas a estrés (Ogilvie, 1992), mostraron unión con B, mayor cuanto mayor fuera el número de grupos fosfato en la molécula. Todos estos compuestos establecieron complejos con el B gracias a la presencia de *cis*-dioles de la ribosa, formando tanto complejos monoborato como bis-*cis*-dioles, siendo éstos últimos más estables. En definitiva, el B es capaz de interaccionar con moléculas biológicas que son sumamente importantes en numerosos procesos vitales (respuestas de estrés, proliferación celular, material genético...).

Al hilo de todo el conjunto de propuestas formuladas de unión a B, se han elaborado hipótesis, como la propuesta por Ricardo y col. (2004), en las que se ha implicado al B en la acumulación de ribosa, pre-requisito para la aparición de vida en la tierra gracias a la estabilización de pentosas a pH alcalino, por la formación de complejos pentosa-borato-pentosa, como ribosa/ribulosa.

Otra de las interacciones propuestas entre el B y componentes biológicos, es su interacción con las serín proteasas, enzimas proteolíticas con funciones estructurales y reguladoras en procesos inflamatorios (Hunt, 2003). En ellas, parece que el B es capaz de unirse covalentemente con el N de grupos amino presentes en el centro activo de dichas enzimas, lo que explica que la actividad de las serín proteasas se vea inhibida al adicionar B al medio.

Además del efecto demostrado en señalización en bacterias, y relacionándose con el efecto estabilizador de membrana al interaccionar con glicolípidos y glicoproteínas, existen varios trabajos que apuntan a que también posee una función biológica en organismos procariotas como cianobacterias con heterocistos (Bonilla y col., 1990) y en bacterias del género *Frankia* (Bolaños y col., 2002). Ambos organismos parecen requerir al micronutriente en la estabilización de sus cubiertas, con el fin de mantener a la nitrogenasa, enzima encargada de la fijación del nitrógeno atmosférico, en condiciones microaeróbicas. En los heterocistos de *Anabaena* parece intervenir en la estabilidad de ciertos glicolípidos que componen su cubierta (García-González y col., 1991), mientras que en *Frankia*, como hemos comentado, el B parece formar parte de un hopanoide bacteriohopanetetrol integrante de la pared, rico en dioles (Bolaños y col., 2002).

Cualquier función no estructural del B, relacionada con moléculas implicadas en procesos de señalización celular y regulación, ya sean extracelulares, de membrana o citosólicos, dependerá de actividades catalíticas del micronutriente, de hecho, en células vegetales la mayor parte del B está ligado a la pared celular (O'Neill y col. 1996) y sólo una mínima cantidad está en otras fracciones celulares. Por tanto, cualquier detección *in vivo* de otros complejos de B diferentes del dímero borato-RGII, requiere técnicas de análisis con una potente capacidad para detectar esas ínfimas cantidades de B.

En este sentido, el desarrollo de marcadores moleculares que se unan a grupos *cis*-diol de la misma manera que el borato, como los ácidos borónicos (Bassil y col., 2004), puede ser útil para “cartografiar” sitios de unión de B en las células, y la mejora de las técnicas para discriminar entre los dos isótopos estables,  $^{10}\text{B}$  y  $^{11}\text{B}$ , aparecen actualmente como las metodologías más útiles de detección *in vivo* de complejos borato diéster (Thellier y col., 2001; Bishop y col., 2004).

Con el ánimo de poder localizar *in vivo* componentes susceptibles de interaccionar con B, se han utilizado, además, distintas técnicas analíticas entre las que se incluiría el compuesto ácido 8-quinolinborónico (8QBA) (Yang y col., 2003) o la utilización de la fluoresceína-5-isotiocianato conjugada con ácido borónico (FITC-B).

En el caso del FITC-B, se ha visto infructuosa su aplicación debido a la inespecificidad de unión del isotiocianato a proteínas. El 8-QBA, que sí parece unirse de forma específica mediante enlaces éster a *cis*-dioles de azúcares como la fructosa, arabinosa o galactosa, y a pesar de su solubilidad y de la estabilidad de la fluorescencia de este compuesto a pH fisiológico, es muy poco sensible, de forma que las cantidades de ligandos requeridas para su detección lo hacen inviable para uso en tejido vivo.

Por tanto, aunque los instrumentos y técnicas de análisis para la detección de esa mínima cantidad de B no ligada a la pared celular se han mejorado, aún son insuficientes para abordar con garantías este reto, por lo que cualquier progreso ulterior dependerá del desarrollo de nuevas metodologías con mayores capacidades analíticas, así como del uso y/o descubrimiento de modelos biológicos óptimos, enriquecidos en determinados complejos B-ligando, susceptibles de ser detectados por las técnicas disponibles, y que además permitan inducir deficiencia de B.

### **3. Modelos biológicos de desarrollo dependientes de B**

Como se ha comentado anteriormente, y a pesar de las dificultades analíticas, varias moléculas con una función no necesariamente estructural, capaces de ligar B, han sido descubiertas o postuladas durante los últimos años, en organismos y procesos fisiológicos altamente dependientes de B, lo cual está ayudando a dilucidar sus posibles funciones en procesos diferentes al mantenimiento estructural de la pared celular.

El hecho de que el B, como micronutriente de plantas, sea especialmente necesario para órganos en fase de crecimiento más que para los maduros, en una fase de mantenimiento (Raven, 1980), apareciendo los primeros efectos de la deficiencia de B en los meristemas (algo ya descrito por Sommer y Sorokin a principios del siglo pasado (1928)) junto con la aparición, relativamente reciente, de estudios que demuestran la esencialidad del B en el desarrollo embrionario de animales (Rowe & Eckhert 1999; Lanoue y col. 2000), pueden considerarse indicios que avalan la hipótesis de un papel para el B en los mecanismos de señalización durante los procesos de organogénesis. Por ello, a falta de técnicas analíticas con una capacidad de resolución más elevada para

detectar ligandos de B con importancia fisiológica, resulta interesante la alternativa de estudiar modelos biológicos de desarrollo en los que sea relativamente sencillo conseguir una deficiencia del micronutriente y en donde ocurran mecanismos de división celular, diferenciación y organogénesis de una forma más o menos rápida como para tener suficiente material donde poder observar y analizar efectos relacionados con la ausencia de B. El desarrollo de nódulos simbióticos de leguminosas y el desarrollo embrionario y organogénesis del pez cebra, parecen, a priori, dos modelos interesantes de estudio de estos procesos dentro de los reinos vegetal y animal, respectivamente.

### **3.1 La simbiosis rizobio-leguminosa como modelo para el estudio del papel esencial del B**

La interacción simbiótica entre leguminosas y rizobios provoca el desarrollo de un nuevo órgano, el nódulo, que lleva asociado un proceso de organogénesis altamente regulado por interacciones moleculares planta-bacteria (Stougaard, 2000). A lo largo del desarrollo de nódulos, ocurre una intensa remodelación de la pared celular y membrana (Brewin, 2004), por lo tanto, los nódulos son un buen material biológico para investigar las funciones estructurales del B. Además, el diálogo molecular entre el macro y el microsimbionte, que conduce al desarrollo de la simbiosis, vienen mediadas por interacciones celulares y moleculares de la planta y la bacteria (Kannenberg y Brewin, 1994; Brewin, 2004) susceptibles de interactuar con él.

Como se detallará más adelante, el B es esencial en las distintas etapas del desarrollo de los nódulos durante la interacción simbiótica rizobio-leguminosa, por lo que este sistema biológico resulta interesante a la hora de analizar funciones del boro como modulador de interacciones celulares en procesos de organogénesis. Además de la alta dependencia de B, la nodulación es un proceso que se puede inducir en plantas desarrolladas bajo deficiencia de B, lo que permite estudiar los efectos producidos por la deficiencia específicamente sobre el proceso simbiótico.

Antes de detallar los estudios realizados del B en estos sistemas simbióticos, se describirá con cierto detalle el proceso de simbiosis leguminosa-rizobio, destacando la

importancia medioambiental y agronómica de la fijación biológica del nitrógeno en general

### **3.1.1 Desarrollo de la simbiosis leguminosa-rizobio**

El Nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es el componente mayoritario en la atmósfera de nuestro planeta, constituyendo aproximadamente el 80% de la misma. Es además parte esencial de componentes biológicos como proteínas y ácidos nucleicos, indispensables para el mantenimiento de la vida. Sin embargo, la mayor parte de los organismos vivos, como es el caso de las plantas, no poseen la capacidad de incorporarlo directamente de la atmósfera en su forma mayoritaria ( $N_2$ ), sino que lo incorporan principalmente en forma de nitratos ( $NO_3^-$ ) o amonio ( $NH_4^+$ ) desde el sistema edáfico. Además, teniendo en cuenta que el nitrógeno es el factor limitante más importante en el desarrollo de las plantas, su aporte al medio edáfico suele llevarse a cabo por adición de fertilizantes químicos comerciales.

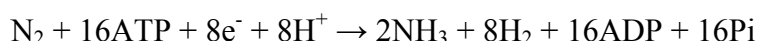
Debido a la necesidad de satisfacer las demandas alimenticias de parte de la población mundial actual, se ha incrementado exponencialmente la producción agrícola, lo que se traduce en una aplicación masiva de los llamados fertilizantes nitrogenados. Éste es, sin duda, un problema a nivel económico (por los elevados costes de producción) y medioambiental (fundamentalmente debido, entre otras, a la contaminación de los sistemas naturales por lixiviación de  $NO_3^-$ ), que puede encontrar una alternativa en la denominada Fijación Biológica de Nitrógeno.

Podemos establecer que la Fijación de Nitrógeno es la etapa más importante del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, considerado especialmente complejo debido a la mayoritaria existencia del elemento formando parte de moléculas estables. La fijación de nitrógeno conlleva la reducción inicial del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) que puede efectuarse abiótica o bióticamente, y supone en todo caso el consumo de una elevadísima cantidad de energía debido a la estabilidad de la molécula por la presencia de un triple enlace que une a los dos átomos de nitrógeno. Abióticamente suele producirse de forma natural, por procesos espontáneos atmosféricos como la acción de los rayos o por descargas eléctricas que dan lugar a diferentes óxidos de nitrógeno, o

bien mediante el proceso industrial de Haber-Bosch. De forma biótica, además de las cianobacterias en sistemas acuáticos, sólo ciertos microorganismos edáficos, todos ellos procarióticos, tienen la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en amonio, que puede ser utilizado por la planta.

La Fijación Biológica de Nitrógeno ofrece una serie de ventajas entre las que destaca la elevada eficiencia en la utilización del nitrógeno por parte de la planta, cercana al 100%, lejos de lo que viene a ocurrir con la aplicación de fertilizantes nitrogenados al suelo, debido a su baja eficiencia por la actuación de procesos como la volatilización (o pérdida en forma gaseosa) o la lixiviación (o pérdida en forma soluble)

Dicha capacidad para fijar biológicamente el  $N_2$  (FBN) reside en la presencia de un sistema enzimático conocido como nitrogenasa, que cataliza la conversión del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a la forma reducida ( $NH_4^+$ ), que es una de las formas biodisponibles del nitrógeno, y tiene lugar de acuerdo con la siguiente reacción:



La nitrogenasa, está constituida por dos metaloproteínas, la ferroproteína o nitrogenasa reductasa, y la ferromolibdoproteína o nitrogenasa (Zehr y col., 1998). Ésta última, contiene el centro activo para la reducción del sustrato y se organiza como un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$ , de 240 kDa, donde tanto  $\alpha$  como  $\beta$  son homólogos. La ferroproteína es un dímero de subunidades idénticas, que posee un peso molecular total de 60 kDa (Rees y col, 2005). La actividad de dicho complejo enzimático requiere grandes cantidades de energía y poder reductor, y una fina regulación del contenido en oxígeno, pues dicho sistema es extremadamente sensible a la presencia de oxígeno. De hecho, la expresión de los genes *nif* (responsables de codificar enzimas implicadas en la fijación de nitrógeno), está regulada tanto por la presencia de oxígeno como de nitrógeno combinado (<http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/>). Se ha de tener en cuenta que, una vez codificadas las enzimas, en los organismos fijadores de nitrógeno se han desarrollado distintas estrategias como método de protección frente a concentraciones elevadas de este elemento. Así, en organismos aerobios donde la presencia de oxígeno es obligada, el consumo de poder reductor es elevado para poder proteger a la nitrogenasa del oxígeno. La anaerobiosis total que ocurre en *Clostridium* o

la producción de grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que hacen de filtro del paso de oxígeno, como ocurre en *Azotobacter*, son algunos ejemplos de las distintas posibles estrategias que pueden adoptar los organismos para evitar la inactividad de la nitrogenasa por presencia de oxígeno.

Dentro del grupo de organismos fijadores de nitrógeno, los hay que realizan la fijación en vida libre y otros que lo hacen estableciendo una relación simbiótica, como la de los rizobios con leguminosas, que se va a describir detalladamente por ser el principal sistema biológico en el que se desarrolla este trabajo.

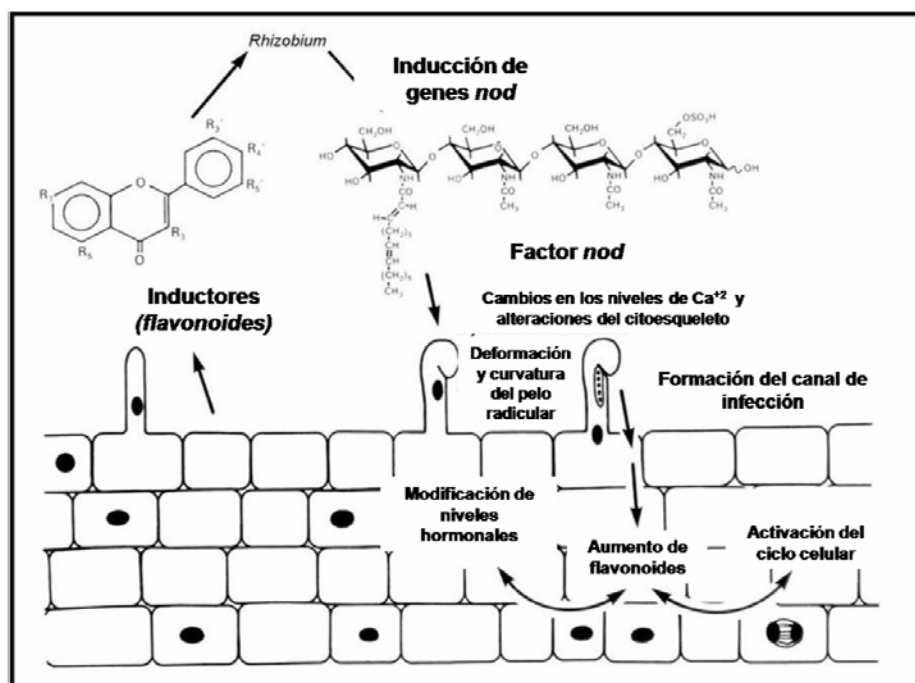
Los rizobios, que incluyen géneros como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, son un grupo de bacterias edáficas capaces de interactuar simbióticamente con plantas leguminosas (pertenecientes a la familia Fabaceae), siempre y cuando el contenido de nitrógeno en el medio sea bajo, y dar lugar a una nueva estructura denominada nódulo, generalmente radicular, donde tiene lugar la fijación de nitrógeno (Brewin, 1991). En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la estructura del nódulo va a crear el ambiente microaerobio adecuado, y la acción de la leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacteroide (forma endofítica del rizobio) para que soporte el metabolismo aerobio requerido en la obtención de energía necesaria para la reducción del  $N_2$ .

Este proceso de interacción entre la planta y el microorganismo está precedido por la actuación de distintos componentes desencadenantes de la cascada de señalización que culmina con el desarrollo del nódulo, donde tendrá lugar el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico y que, para su estudio, puede dividirse en varias fases o etapas que aparecen resumidas a continuación y esquematizadas en las correspondientes figuras (Brewin, 1991; Brewin y col., 1992; Hirsh, 1992; Kijne y col., 1992; Ridge, 1992; Vijne y col., 1993):

En la **etapa inicial de desarrollo del nódulo o preinfección** (Fig. 4), tiene lugar el reconocimiento externo entre la bacteria y la planta gracias a la intervención de distintos componentes (exudados radiculares, componentes nutricionales, factores Nod, polisacáridos superficiales,...), que trataremos particularmente con detalle. Esta etapa inicial provoca la alteración del crecimiento de los pelos radiculares y su posterior

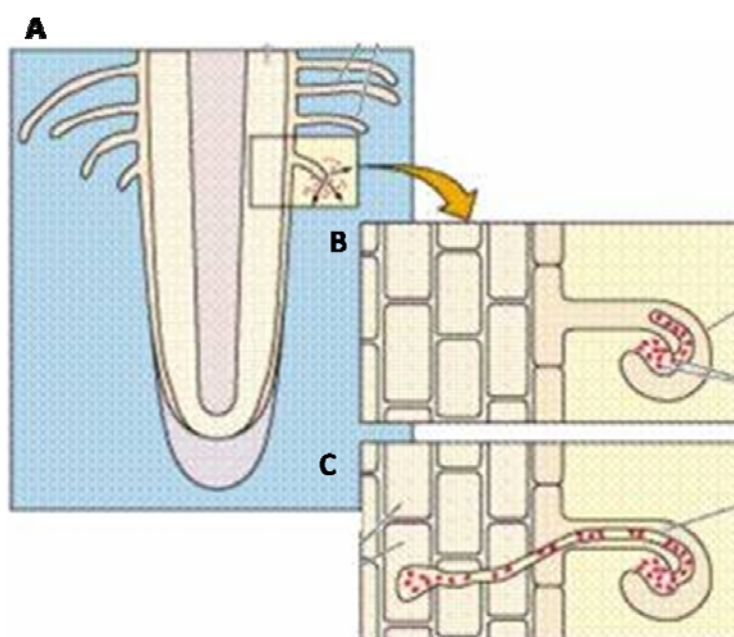


deformación y curvatura. Es en este punto donde las bacterias se agrupan e interaccionan físicamente con la planta, provocando el cierre total del pelo radicular que englobaría a las bacterias.



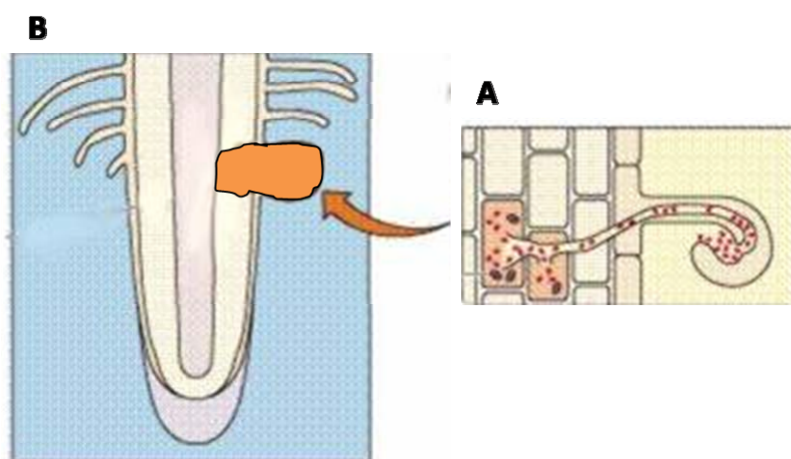
**Figura 4.** Etapa inicial de desarrollo del nódulo o preinfección. *Adaptada de Hirsh, 1992)*

La **etapa infectiva** (Fig.5) comienza con la entrada de las bacterias en la planta a través de una estructura tubular denominada canal de infección, en cuya formación han participado los denominados factores Nod.



**Figura 5.** Etapa infectiva A) La raíz exuda inductores de factores Nod que culminarán con la entrada de la bacteria en la raíz (B) y la formación del canal infectivo (C).

Posteriormente se produce la **invasión celular** (Fig 7), que tiene lugar cuando el canal de infección llega a la célula vegetal. En este momento se produce un fenómeno de endocitosis en el que la bacteria queda rodeada por la membrana plasmática de la célula vegetal. El crecimiento apical de la pared del canal ha cesado y únicamente tendrá lugar el crecimiento de la membrana del mismo. En plantas con nódulos de crecimiento indeterminado (nódulos indeterminados), como guisante (*Pisum sativum*) o alfalfa (*Medicago sativa*), el canal de infección se irá ramificando hasta llegar a todas las células que vayan a ser infectadas, y la división celular en el nódulo tendrá lugar sólo en el meristemo apical donde se encuentran las células no infectadas. En plantas con nódulos de desarrollo determinado (nódulos determinados), como soja (*Glycine max*) o judía (*Phaseolus vulgaris*), el desarrollo de canales de infección es transitorio, pues las primeras células invadidas a través de canales incipientes continúan dividiéndose dando lugar a células hijas ya infectadas.



**Figura 6.** Etapa invasiva en la formación del nódulo. A) Ésta comienza con la llegada del canal infectivo a la célula vegetal, momento en el que tiene lugar un fenómeno de endocitosis B) La etapa invasiva culmina con la formación del nódulo.

La **maduración del nódulo** (Fig.9) está marcada por la proliferación y diferenciación de las bacterias a forma fijadora de nitrógeno o *bacteroides*, siempre rodeados de una membrana peribacteroidea, de origen vegetal, para constituir en conjunto el denominado simbiosoma.

Finalmente, el nódulo entra en la **etapa de senescencia**, en donde acontece un proceso de degeneración de las células infectadas, hasta que el nódulo deja de ser activo.

La simbiosis es un proceso de interacción y comunicación específico entre los organismos implicados. Así pues, la elevada especificidad de interacción entre la planta y el microorganismo nos lleva a pensar en la gran importancia del papel que juegan los componentes aportados por ambos actores en la misma. De hecho, el proceso simbiótico ha sido considerado a veces, por parte de la literatura científica, como un fenómeno controlado de interacción incompatible (Rolfe & Gresshoff, 1988) dadas las similitudes que se encuentran entre los procesos simbióticos y patogénicos.

El establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio tiene lugar gracias a una cascada de señalización que ha de estar finamente regulada con el fin de evitar la existencia de una respuesta de defensa por parte de la planta. Desde este punto de vista, parece que el rizobio es capaz de bloquear el proceso de defensa desencadenado típicamente en la planta ante la interacción con patógenos, siempre bajo el control del macrosimbionte.

Ya desde las etapas iniciales del proceso simbiótico, con el reconocimiento de los factores Nod, que detallaremos a continuación, se ha descrito la existencia de una supresión de respuestas de defensa, incluyendo una reducción en la acumulación del ácido salicílico (Martínez-Abarca y col., 1998) o en la generación de ROS (Shaw y Long, 2003).

De la misma manera, los polisacáridos superficiales bacterianos, cuya intervención en el desarrollo de la simbiosis describiremos más adelante, van a jugar un papel clave en la supresión de las respuestas de defensa. Por ejemplo, la acción del LPS se ha mostrado presente en todo el proceso interactivo, siendo responsable de un reajuste de transcritos relacionados con respuestas de defensa (Tellström y col., 2007).

#### *Etapas inicial de desarrollo del nódulo o preinfección*

El proceso simbiótico acontece en la porción del suelo en íntimo contacto con el sistema radicular en crecimiento, denominado *rizosfera*, cuyas características fisicoquímicas y biológicas difieren de las de otras partes del suelo. Más concretamente, la interacción simbiótica tiene lugar en una zona de la rizosfera de influencia de sustancias liberadas por la planta en íntimo contacto con el tejido radicular, a lo que se ha denominado *rizoplano* (Loria y col., 2003). A ella se liberan entre el 10% y el 30% de los

fotosintatos de la planta como exudados radiculares, entre los que se encuentran los flavonoides (derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona), cuya composición depende de la especie y cuya secreción al medio dependerá además de las condiciones existentes en él, desencadenando respuestas específicas en los rizobios (Schlaman y col., 1992; Lawson y col., 1995). Estos metabolitos tienen una diversidad de funciones en las plantas que van desde su actividad antioxidante hasta la inhibición del transporte de auxina (Winkel-Shirley, 2001). En general, la secreción de estos exudados radiculares a concentraciones nanomolares, provocan la quimiotaxis activa de los rizobios hacia la superficie radical (Sánchez y col., 1991). En cambio, estos mismos flavonoides a concentración micromolar, activan en *Rhizobium* los genes responsables de la nodulación (genes *nod*).

Los genes *nod*, *nol* y *noe* codifican alrededor de 25 proteínas que son requeridas para la síntesis y secreción de los factores Nod (Gage, 2004). Los flavonoides están involucrados en la activación de algunos de los factores de regulación transcripcionales NodD, que participan, junto con otros reguladores (Long, 1996), en la inducción de la transcripción del resto de genes de síntesis de los factores Nod (Bisselin y Geurts, 2002). Los factores Nod son moléculas de señalización tipo lipoquitooligosacáridos (Dénarié y col., 1996) en cuya composición se encuentra un esqueleto N-acetil-D-glucosamina, unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, con un ácido graso anclado en el azúcar no reductor, y grupos sulfúril, fucosil, manosil o arabinosil en el extremo reductor, además de otros posibles sustituyentes como derivados del glicerol o del fucosil (Dénarié y col., 1996). Las distintas modificaciones que pueden presentar los factores Nod dependen de la estirpe de rizobio y son otorgadas por los distintos genes *nod* presentes en la bacteria. Así, la variación en el número de monómeros N-acetil-D-glucosamina, los distintos sustituyentes tanto en el extremo reductor como no reductor que puede presentar, como sería la aparición de un grupo sulfato en el extremo reductor esencial para la nodulación establecida por *S. meliloti* pero no requerida por *S. fredii* (Noreen y col., 2003), o la estructura del lípido (Stougaard, 2000), son aspectos estructurales que van a condicionar la interacción entre la planta y la bacteria y por tanto, van a ser determinantes de su especificidad.

Además de aspectos cualitativos existen aspectos cuantitativos de los factores Nod que también son característicos de la estirpe de rizobio y que confieren especificidad a la

interacción planta-microorganismo. Por ejemplo, en alfalfa (*Medicago sativa*), la deformación del pelo como respuesta a la presencia de factores Nod ocurre a concentraciones por debajo del rango nanomolar (Roche y col., 1991), mientras que son necesarias concentraciones más elevadas (de entre  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  M) para provocar la organogénesis del nódulo en el tejido cortical interno (Truchet y col., 1991).

Con todo, se ha mostrado en un estudio reciente de Giraud y col. (2007) la posible vía alternativa a los factores Nod que ofrecen las citoquininas en la iniciación del proceso simbiótico en algunas las cepas (*Bradyrhizobium* sp. ORS278 y BTAi1) que nodulan a dos especies de leguminosas acuáticas *Aeschynomene sensitiva* y *A. indica*. Estas cepas bacterianas carecen de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* y aún así son capaces de interaccionar simbióticamente con dichas leguminosas, prescindiendo de los denominados factores Nod para nodular (Giraud y col, 2007). Este papel de las citoquininas ya fue demostrado con anterioridad en un mutante de *Sinorhizobium* que no producía factores Nod pero que llevaba un gen para la producción de citoquininas en trans, lo que le permitía producir nódulos en alfalfa (Cooper y Long, 1994)

Se han identificado distintos receptores encargados del reconocimiento de los factores Nod por parte de la planta. Éstos son codificados por distintos genes, denominados *LYK3* en *Medicago truncatula* (Limpens y col., 2003), *NFR1* y *NFR5* en *Lotus japonicus* (Madsen y col., 2003; Radutoiu y col., 2003), y *SYM10* en *Pisum sativum* (Madsen y col., 2003). Estos receptores pertenecen a la familia denominada “receptores tipo quinasas” (receptor-like kinases, RLKs, en inglés) y contienen un dominio de lisina (LysM) que es el sitio extracelular de interacción con componentes N-acetil-D-glucosamina (el esqueleto lipoquitinolígosacárido) de lo factores Nod (Steen y col., 2003, 2005).

Es importante destacar que los factores Nod son un sustrato de las quitinasas de plantas (Schultze y col., 1993; Staehelin y col., 1994a, 1994b), enzimas extensamente estudiadas en interacciones planta-patógeno (Flach y col., 1992; Meins y col., 1992; Collinge y col., 1993; Stinzi y col., 1993), y en la respuesta hipersensible a rizobios (Staehelin y col., 1992; Vasse y col., 1993; Parniske y col., 1994). Se ha observado que, modificaciones estructurales en los factores Nod determinan su estabilidad frente a la hidrólisis provocada por estas enzimas (Schultze y col., 1993, 1994b; Heidstra y col.,

1994; Staehelin y col., 1994). Además, como se ha comentado anteriormente, están implicados en la supresión de la acumulación de ácido salicílico y de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la planta (Martínez-Abarca y col., 1998; Bueno y col., 2001; Shaw y Long, 2003), y su aplicación en no leguminosas genera una característica respuesta de defensa (Staehelin y col., 1994). También están involucrados en la síntesis de fitoalexinas, que son componentes de bajo peso molecular sintetizados en presencia de organismos patogénicos (Savouré y col. 1994, 1997). De este modo, se puede afirmar que existe una implicación de los mismos en que la interacción simbiótica no torne a patogénica.

Con todo, en esta primera etapa, es necesario que se produzca un correcto reconocimiento externo entre la bacteria y la planta.

Se pueden establecer varios cambios que los factores Nod provocan en las etapas tempranas del proceso de nodulación, dentro de los que destacarían el influjo del calcio citoplasmático a las zonas del ápice de raíz (Felle, 1999) o las variaciones periódicas del calcio citoplasmático ( $\text{Ca}^{2+}$  spiking, en inglés) en la zona perinuclear (Ben Amor y col., 2003; Peiter., 2007), la inmovilización de iones, la alcalinización citoplasmática (Felle y col., 1995), la despolarización de la membrana (Ehrhardt y col., 1992), y la activación de genes del ciclo celular (Savouré y col., 1994; Yang y col., 1994). Todo ello se traduce en una serie de alteraciones morfológicas que culminan en la deformación del pelo radicular y en el desarrollo del primordio nodular (Spaink H., 1991; Kondorosi y col., 1995).

Precisamente, la deformación y curvatura del pelo radicular, que conlleva la reorientación del crecimiento del mismo, se relaciona con una reorganización del citoesqueleto en las células epidérmicas y corticales, que redirigiría el tráfico vesicular hacia la zona de deformación y curvatura (Miller y col., 1999; Catoira y col., 2001). De forma más concreta se establece que, precisamente los filamentos de actina, que dirigen el material hacia el ápice de la raíz, se fragmentan y reensamblan en presencia de los factores Nod (Cárdenas y col., 1998), y los microtúbulos se reorganizan en la zona de curvatura y se encargan de determinar la elongación de la raíz en una nueva dirección (Timmers, 1999; Gage, 2004; Sieberer y col., 2005), así como de organizar los filamentos de actina (Sieberer y col., 2002). En este fenómeno, el influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al

ápice de raíz va a producir el aumento del calcio citosólico, que posibilita salida masiva de iones  $\text{Cl}^-$  y que se traduce finalmente en la despolarización de la membrana (Felle, 1999).

Por tanto, uno de los efectos morfológicos tempranos que se producen tras la aparición de los factores Nod, es el cese del crecimiento apical y el posterior engrosamiento del meristemo de la raíz (Lhuissier y col., 2001). Los rizobios van a secretar factores Nod que producirán una alteración muy localizada en la síntesis de pared celular, lo que se traducirá una reorientación progresiva del ápice radicular. Esto se ha vinculado a la posible relación entre los factores Nod y la inhibición de la síntesis de celulosa o de la hemicelulosa de la pared de células de la raíz, que además explicaría las respuestas tempranas que se desencadenan en la planta (Brewin, 2004).

El fenómeno de deformación y curvatura del pelo radicular producido por los factores Nod (Spaink, 1991), no se da por igual en cualquier parte de la raíz sino que es un fenómeno localizado que coincide con una zona concreta del tejido radicular donde va a finalizar el proceso de crecimiento (Gage, 2004). Tanto en la zona donde el crecimiento es activo (localizada en el ápice radicular) como la zona en donde el crecimiento ha cesado (tejido maduro), existe una respuesta refractaria a la deformación provocada por los factores Nod (Gage, 2004). Se sabe además que la adición de factores Nod purificados es suficiente para producir la deformación y curvatura del pelo radicular pero no para generar la estructura denominada “cayado de pastor”, que describiremos más adelante, y que termina atrapando a las bacterias y cerrando el lugar por donde van a entrar a la planta.

Una cuestión a señalar es que la colonización de la planta por el rizobio no siempre tiene lugar a través de los pelos radiculares en crecimiento, la entrada también puede efectuarse a través de zonas coincidentes con el lugar por donde emergen las raíces laterales, donde parecen activarse respuestas en las células vegetales necesarias para la formación del nódulo, y que no se activan en tejidos maduros (Mathesius y col., 2000). Precisamente estas zonas coinciden con el lugar por donde las bacterias entrarán a la planta vía rotura de la epidermis. Este fenómeno de entrada del rizobio en la planta tiene lugar en la leguminosa tropical *Sesbania rostrata* (Goormachting y col, 2004) solo cuando las condiciones del entorno de la raíz son anaerobias. Cuando las condiciones de

la rizosfera cambian a aerobias, la invasión retorna al pelo radicular deformado y curvado.

Algunos procesos desencadenados por los factores Nod, como es el caso de la reorganización del citoesqueleto, van a provocar la activación de las divisiones celulares (reactivación del ciclo celular) en zonas internas de la raíz, que van a culminar en la formación del *primordio nodular*. La activación simultánea de ciertas células del periciclo próximas al protoxilema y del interior del córtex (Timmers y col., 1999), en *Medicago sativa*, van a producir divisiones anticlinales que van a terminar dando lugar a un primordio nodular polarizado, lo que permite que se mantenga la actividad meristemática en el ápice, causando un crecimiento del primordio hacia el exterior. Mientras tanto, las capas celulares inferiores se van a ir diferenciando (Foucher F. y Kondorosi E., 2000), lo que explica que en este tipo de nódulos podamos distinguir distintas zonas, que veremos más adelante, en función del estado de diferenciación de las células. Esto ocurre también, aunque a distintos tiempos, en guisante (Scheres y col., 1990) y trébol (Lotcka y col., 1997), y en todos ellos es característico el desarrollo de un nódulo cilíndrico o bifurcado con un meristemo apical *indeterminado*, donde la mitosis celular ocurre en células no infectadas.

Este proceso no se da por igual en todas las leguminosas. En el caso de judía (Taté y col. 1994) o soja (Calvert y col., 1984), la activación de la división celular ocurre primero en la zona inmediatamente subyacente a la epidermis (hipodermis), seguida de la activación de las células del periciclo. Los dos meristemas convergen generando el primordio nodular, en el cual podemos encontrar células no vacuoladas procedentes de las divisiones de la hipodermis conformando el tejido central del nódulo, y células con un elevado grado de vacuolización procedentes de las divisiones en el periciclo, componiendo el parénquima nodular que rodea al tejido central. Como resultado de todo ello, se genera un nódulo de forma esférica con meristemas *determinados* (meristemas no permanentes) en los que la mitosis se produce en células ya infectadas. Algo similar ocurre en *Lotus japonicus*, con la salvedad de que el inicio de las divisiones celulares ocurren en la zona media del córtex (Szczyglowski, 1998). En general, en este tipo de nódulos, la diferenciación de las células infectadas ocurre de forma sincronizada y el nódulo maduro va a presentar una población homogénea de bacteroides activos (Franssen y col, 1992).



Esta primera etapa del desarrollo del nódulo culmina con el contacto físico entre ambos simbios, la adhesión del rizobio a los pelos radiculares. Para ello, como ocurre en la interacción *Rhizobium leguminosarum*- *Pisum sativum*, un anclaje dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que está mediado por una proteína llamada ricadhesina presente en la mayor parte de los rizobios (Smit y col., 1989), confiere la capacidad de unión del rizobio a la raíz. Tras este primer anclaje, tiene lugar un contacto más estrecho entre ambos simbios consistente en la síntesis de fibrillas de celulosa que envuelven a las bacterias, que no es imprescindible para el establecimiento de la interacción (Smit y col. 1987) siendo, no obstante, una ventaja a nivel competitivo en la rizosfera (Gage, 2004).

Además de las ricadhesinas y de las fibrillas de celulosa sintetizadas por la planta, existen una serie de lectinas localizadas en los meristemos radiculares que, además de promover el crecimiento bacteriano, juegan un papel clave en la interacción planta-microorganismo otorgando especificidad, al permitir la unión de ciertas bacterias a la superficie radicular, gracias a su anclaje a la pared celular vegetal y a los polisacáridos superficiales rizobianos (Hirsch, 1999). Esto lleva a pensar en la enorme importancia que la especificidad juega en este proceso y, concretamente, en la etapa inicial del mismo, puesto que la raíz ha de mostrarse infectiva a la bacteria adecuada, y culminar con la curvatura del pelo radicular y la aparición del canal de infección.

Tras la acumulación de los rizobios en la superficie de la raíz, tiene lugar la formación del denominado “cayado del pastor” (shepherd’s crook, en inglés) donde la bacteria queda atrapada y crece. Es entonces cuando se produce la degradación de la pared celular y la invaginación de la membrana que da paso a la entrada de la bacteria a la planta a través del canal de infección (Rige, 1985). El fenómeno de degradación de la pared celular, tiene lugar gracias a una actividad enzimática cuya dirección, mediada bien por parte de la bacteria o bien por parte de la planta, aún no ha sido clarificada. Lo único establecido al respecto es que, por su propia estructura, los factores Nod pueden interaccionar con las fibras de celulosa y de alguna manera actuar como inhibidores en la síntesis de pared celular en el ápice radicular (Doblin y col., 2002). De hecho, se ha demostrado el aumento en la degradación de la pared celular de raíz de trébol, en presencia de los factores Nod (Mateos y col., 2001). Además, los rizobios poseen sistemas enzimáticos capaces de degradar por hidrólisis las fibras de celulosa y otros

polisacáridos de la pared celular vegetal (Mort y Grover, 1987; Mateos y col., 2001). Por otro lado, se ha de tener en cuenta que en presencia de nitrógeno biodisponible en el medio, este fenómeno de degradación no acaece, lo que lleva a pensar en el control que también ejerce la planta en el proceso (Gage, 2004).

### *Etapas infectiva*

Al mismo tiempo que los factores Nod activan la división celular en raíz para la generación del primordio nodular, los rizobios logran introducirse en el pelo radicular a través de la estructura tubular de origen vegetal denominada *canal de infección*. Las células corticales subyacentes se tornan a altamente polarizadas lo que guía al canal de infección hasta el primordio nodular. El establecimiento del canal de infección, únicamente tiene lugar en raíces en crecimiento, salvo excepciones, por lo que es lógico pensar que existe una asociación entre la expansión del canal y el núcleo del pelo radicular. De hecho existe una conexión citoplasmática entre ambos (Gage, 2004), lo que presumiblemente provoca la necesaria reorganización del citoesqueleto, que va a desembocar en una serie de cambios morfológicos necesarios para que se forme el canal.

Así, el inicio de la etapa infectiva va a tener lugar tras la degradación de la pared vegetal y la invaginación de su membrana que va a dar paso a la entrada de los rizobios en la planta, como veremos a continuación. Los rizobios atrapados por la raíz, van a propiciar un acúmulo de factores Nod en la zona, lo que se ha visto necesario para la iniciación del canal de infección, por su implicación en el remodelamiento de la pared celular y la reorganización del citoesqueleto (Brewin, 2004).

Un factor importante a tener en cuenta en el inicio de la formación del canal de infección, es la necesaria biosíntesis de pared celular y la secreción de distintos componentes glicoproteicos que conformarán la matriz extracelular y que rodearán a las bacterias en el canal. Durante el desarrollo del canal de infección, ambos simbiontes van a participar en su formación. La estructura de la pared del canal es muy similar a la estructura de la pared celular del pelo radicular, y el lumen del canal va a contener una matriz similar a la matriz extracelular de las paredes vegetales en leguminosas (Rae y col., 1992). Uno de los componentes de la matriz del canal, y del que se hablará más

adelante, es la extensina reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 265 (Rathbun y col., 2002). Estas extensinas características de leguminosas, que son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, son secretadas por las células de la raíz y además de participar en la síntesis de pared del canal, parecen implicadas en respuestas de defensa de plantas (Bradley y col., 1992). Estas extensinas, bajo condiciones oxidativas, en presencia de peróxido de hidrógeno, parecen ensamblarse y polimerizar permitiendo la progresión de las bacterias a lo largo del canal, que continuarían dividiéndose en su interior (Rae y col., 1991; Wisniewski-Dye y Downie, 2002). Al mismo tiempo, la secreción de componentes de pared y de matriz supone una barrera de difusión de oxígeno que protege a la nitrogenasa de su inactivación (Bradley y Fry, 1997; Wisniewski y col., 2000).

Existen casos en los que la infección no se da a través de canal sino que los rizobios se liberan directamente desde las gotas de infección al citoplasma de las células vegetales del córtex, que tornan a meristemáticas (Lotočka y col., 2000).

No podemos olvidar la implicación de los polisacáridos superficiales bacterianos en el fenómeno de iniciación de la infección. Tanto los exopolisacáridos (EPS) como los lipopolisacáridos (LPS), los polisacáridos capsulares (KPS) y los glucanos cíclicos (GCs) van a estar involucrados en el proceso de nodulación, aunque su importancia en el proceso va a depender factores como el tipo de nódulo (determinado o indeterminado) o el par simbiote de que se trate. Por ejemplo, el EPS va a ser indispensable para la formación de nódulos indeterminados de alfalfa (Leigh, 1985) pero no para nódulos determinados formados en la interacción *Sinorhizobium fredii-Glycine max* (Borthakur y col., 1986). En el caso de mutantes *exoY* de *S. meliloti*, afectados en la síntesis de succinoglucano, no parecen tener afectadas ni la capacidad de inducción de la curvatura del pelo radicular ni la de inducción del canal de infección pero sí la de elongación del mismo, como también ocurre con mutantes *exoH* que producen un succinoglucano de alta masa molecular con pérdidas de grupos succinil. En cambio, mutantes *exoZ*, que regula la acetilación del succinoglucano, están afectados tanto en el inicio como en la elongación del canal de infección (Cheng y Walker, 1998). Destacar además que tanto para el succinoglucano como para el EPS II, se ha establecido que prevalece el papel que juegan en señalización frente al estructural. Otro

factor a tener en cuenta, es la relación del EPS y la supresión de la respuesta defensiva por parte de la planta en distintos momentos de la simbiosis (Frayse, 2003).

En el caso de los glucanos cíclicos (CGs) su papel ha sido considerado en el anclaje de la bacteria a la superficie radicular así como en la adaptación a variaciones osmóticas en el proceso simbiótico (Gore y Miller, 1993). También existen trabajos con mutantes en la síntesis de estos componentes periplásmicos que revelan su implicación en el abortamiento del canal de infección (Dylan y col., 1990), en el desarrollo de la simbiosis (Inon de Iannino y Ugdale, 1993; Crespo-Rivas y col., 2009), y como supresores de una respuesta de defensa por parte de la planta (Bhagwat y col., 1999; Dunlap y col., 1996; Mithöfer y col., 2001). Dentro del ámbito de acción de estos componentes bacterianos, ha sido ampliamente discutida su acción pasiva en el proceso simbiótico dado que su acción en osmoadaptación y en el aumento de la solubilidad de flavonoides (Breedveld y Millar, 1994) no es única dependiendo del par simbiote de que se trate.

Es lógico pensar que los polisacáridos capsulares (KPS), por su localización rodeando a la membrana de la bacteria, van a desempeñar su función en el momento en que la bacteria y la planta entren en contacto. Entre otros, los KPS parecen estar implicados en la protección de la bacteria frente a las defensas generadas por la planta (Campbell y col., 1998). En cualquier caso, la determinación de su participación en el proceso simbiótico encuentra serias dificultades dada la interconexión en la biosíntesis de los distintos polisacáridos. Uno de los trabajos sobre KPS en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa reveló la acción del KPS en estadios tempranos de reconocimiento de *S. meliloti* por el efecto acumulativo de transcritos codificantes de enzimas de síntesis de isoflavonoides (Becquart-de-Kozak y col., 1997). En otros trabajos se habla del papel en el establecimiento y desarrollo del canal de infección por su capacidad de sustituir al EPS (Kiss y col., 2001; Reuhs y col., 1993).

En sí, tanto el EPS I, antígeno K y el EPS II parecen originar distintas morfologías del canal de infección lo que evidencia que estos polisacáridos promueven la invasión bajo distintos mecanismos de actuación (Frayse y col., 2003).

En el caso del LPS, mutantes en dicho componente bacteriano parecen tener un efecto más dramático en la formación de nódulos determinados que en los indeterminados (Frayse y col., 2003) aunque la controversia al respecto es enorme. El LPS, componente constitutivo de la membrana externa bacteriana, tiene dos efectos claros en la simbiosis. Por un lado, existen trabajos que relacionan a este polisacárido con una inhibición en la respuesta de defensa de la planta (Albus y col., 2001; Tellström y col., 2007) y por otro, también es conocida su implicación en la adaptación a las condiciones del medio. Claro ejemplo de ello es el incremento de su hidrofobicidad bajo condiciones microaeróbicas (Kannenberg y Carlson, 2001), con implicación en la introducción del canal de infección en las células corticales, y que además parece actuar en la diferenciación de bacteroides (Frayse y col., 2003). Además, en algunos trabajos, en mutantes en el LPS de *S. meliloti*, se ha determinado que pese a su capacidad de establecer la interacción simbiótica, éstos mostraban una reducción de la fijación además de ser menos competitivos frente a la cepa silvestre, lo que relacionaba al LPS rizobiano con la especificidad en la interacción (Campbell y col., 2003).

En cualquier caso, la implicación de los polisacáridos bacterianos en el proceso simbiótico va a depender de múltiples factores condicionantes (tipo de desarrollo nodular, el momento del proceso, las condiciones existentes,...), lo que impide establecer una línea de actuación clara para cada uno de ellos. De hecho, lo que se ha observado en general, es el efecto pleiotrópico que tienen sus mutantes en diferentes vías metabólicas, por lo que poder determinar su función es arduo complicado (Breedveld y col., 1993; Skorupska y col., 1995; Fraysse y col., 2003; Janczarek y col., 2004).

Como se ha mencionado, los polisacáridos de superficie bacterianos juegan un importante papel en las etapas de infección del proceso interactivo y también durante el proceso de invasión. De hecho, existen mutantes en el exopolisacárido bacteriano (EPS), cuya represión se ha descrito tras la invasión (Reuber, 1991), que ni son capaces de invadir ni de formar canales de infección (Gray y Rolfe, 1990). También se han descrito mutantes en el LPS de *S. meliloti*, que, siendo capaces de formar nódulos activos, tenían disminuida la capacidad de infección con respecto a la cepa silvestre (Lagares y col., 1992) o mutantes en el LPS de *R. leguminosarum* 3841 desencadenantes de una respuesta citológica de defensa que provocaba la disminución o

desaparición de la capacidad invasiva de la bacteria (Perotto y col., 1994). En general, la reducción de la capacidad invasiva de mutantes en el LPS bacteriano, se relaciona con el papel que juega como supresor específico de las respuestas defensivas desencadenadas en la planta, que actuaría desde los primeros momentos de la interacción. Posiblemente esta acción supresora, que también poseen los factores Nod, se establece gracias a sistemas de percepción que la planta posee de estos mismos componentes, lo que le permite discernir entre microorganismos patógenos o simbioses (Tellström y col., 2007; Soto y col., 2009).

Además de la importancia de componentes bacterianos como los polisacáridos superficiales, es importante atender a la dinámica de poblaciones bacterianas del interior del canal para comprender la progresión de las bacterias a través del mismo. Algunos trabajos proponen un modelo de crecimiento basado en sectores. Se plantea que la mayor parte de los canales siguen un crecimiento similar. Las bacterias cercanas al ápice del canal son las que mantienen un crecimiento activo poblando al nódulo, mientras que aquellas bacterias que distan del ápice no poseen crecimiento. Este tipo de dinámicas atiende a un modelo generalizado de crecimiento apical sobre el crecimiento transversal (Gage, 2004). Se ha de tener en cuenta que la mayor parte de los nódulos son clonales, están inducidos por una sola población bacteriana pese a que pueden existir nódulos mixtos, y en cualquier caso, solo aquellas poblaciones establecidas en el ápice del canal de infección mantendrían un crecimiento indefinido (Brewin, 2004).

#### *Desarrollo del canal de infección e invasión celular*

Como se ha descrito, en el comienzo de la formación de los nódulos indeterminados, tiene lugar la curvatura del pelo radicular y el inicio del canal de infección, con su consiguiente crecimiento, así como la activación del ciclo celular en las células corticales. Paralelamente, en la zona interna de la raíz existe también una activación del ciclo celular. Concretamente son las células del periciclo las primeras en responder a la presencia de los rizobios compatibles, gracias a la acción de los factores Nod (Ardourel y col., 1994). Tras la activación de las células del periciclo, las células del córtex interno reactivan su ciclo celular, gracias, de nuevo, a la participación de los factores Nod, y, como resultado, tiene lugar la formación del primordio nodular, cuya elevada vascularización y la presencia de células de transferencia son indicativas de su función

de sumidero de fotosintatos provenientes de la planta (Brewin, 2004) El conjunto de células que forman el primordio del nódulo, serán las primeras en recibir a las bacterias endofíticas que se diferenciarán a bacteroides. El proceso de activación del ciclo continúa progresando hacia el exterior, afectando al tejido del córtex medio, cuyas células no infectadas darán lugar al meristemo del nódulo. Al mismo tiempo, células del córtex externo comienzan a activarse y a centralizar la posición del núcleo, con el fin de alinearse dando lugar a un continuo entre los puentes citoplasmáticos que formarán el *canal preinfectivo* por cuyo interior va a propagarse el canal de infección.

La estructura del canal preinfectivo está polarizada, de tal forma que el núcleo del mismo se posiciona en contra del interior de la pared celular. Así, el alineamiento del canal preinfectivo va a condicionar el crecimiento del canal de infección a través de las células del córtex externo. El canal de infección, iniciado en la zona de curvatura del pelo radicular, se fusiona con la pared celular de las células epidérmicas y las bacterias son liberadas al espacio intracelular, donde se producirá la invaginación de la pared debilitada de las células subyacentes, y el canal de infección progresará hacia el interior llegando hasta el primordio nodular a través del canal preinfectivo. En este momento las células de la zona media del primordio se diferenciarán dando lugar al meristemo del nódulo que se desarrollará a cierta distancia de la zona de infección. Tras la formación del meristemo, la activación celular se irá perdiendo progresivamente, y el nódulo irá emergiendo desde la superficie radicular (Timmers y col., 1999).

De manera generalizada, en vegetales, la formación de nuevas estructuras como es el caso de la formación del nódulo, implica que células ya diferenciadas, que normalmente se encuentran en la fase quiescente o  $G_0$ , vuelvan entrar en el ciclo celular. En guisante, las células corticales externas se activan pero no se dividen, algo que no ocurre con las células activadas del periciclo y con las células interiores y medias corticales. Esto se traduce en la expresión diferencial de ciertos genes del ciclo celular, que son utilizados como marcadores para determinar la fase del ciclo celular en la que se encuentran. Así, en las células corticales externas, existe expresión del gen *H4* específico de la fase S que precede a la formación de los puentes citoplasmáticos, lo que indica que, tras la inoculación con *R. leguminosarum*, las células pasan de  $G_0/G_1$  a la fase S, de replicación de la dotación génica. En cambio, las células corticales internas y medias aumentan la expresión de *cyc2* que codifica la ciclina B, lo que verifica el paso de  $G_2$  a mitosis (Fase

M). La expresión de este gen no tiene lugar en las células corticales externas, que por tanto quedan detenidas en la fase G<sub>2</sub>. El canal de infección no atravesará las células en división sino que progresará a través de los puentes citoplasmáticos de las células que han quedado bloqueadas en la fase G<sub>2</sub>. De hecho, la extensión de la división celular a las zonas del córtex externo, daría como resultado la inhibición de la infección (Foucher y Kondorosi, 2000).

Este modelo generalizado no se da exactamente igual en todos los pares simbióticos ni tan siquiera dentro de la misma tipología de nódulo. En el trabajo de Timmers y col. (1999) se muestra cómo en *M. truncatula*, las células corticales que contienen el canal preinfectivo se dividen gracias a que las células hijas mantienen la estructura del mismo. En este mismo trabajo se señala además que, así como en guisante la formación del canal preinfectivo está condicionada por la presencia de los factores Nod de *R. leguminosarum*, en alfalfa éstos no provocan su formación, indicando la existencia de alguna otra señal que pudiera desencadenar la formación del mismo. Esto, además de denotar la existencia de fenómenos específicos dependientes de la pareja simbiótica, hace pensar en la posible existencia de una señal, distinta a los factores Nod, que intervenga en el proceso. De hecho, esto explicaría casos como el de ciertos fenotipos de alfalfa que son capaces de nodular espontáneamente sin la presencia de factores Nod (Truchet y col., 1989).

Por otra parte, todo este proceso de activación celular conlleva la necesaria reorganización de los microtúbulos del citoesqueleto en los distintos tejidos radiculares. Estas reorganizaciones tienen lugar primeramente en la zona interna cortical y en el periciclo, pero las reorganizaciones más drásticas acontecen en la zona externa, donde, como se comentó, tiene lugar la curvatura del pelo radicular, la formación del canal preinfectivo y el inicio y crecimiento del canal de infección. En las células que contienen el canal preinfectivo, los microtúbulos se orientan anticlinalmente y paralelos entre sí, posicionándose de forma centralizada respecto a los puentes citoplasmáticos. Durante la infección, los microtúbulos van a formar una densa red rodeando al canal de infección que conectará el núcleo de la célula con el ápice del mismo. El crecimiento hacia el interior de los canales de infección, culminará en el momento en que éstos hayan penetrado en el primordio, donde los microtúbulos se acumulan en la zona de



avance del canal. En aquellas células corticales por donde el canal de infección ha pasado, los microtúbulos apenas son visibles (Timmers y col., 1999).

El canal de infección se origina por la invaginación de la pared celular de las células del pelo radicular. En el momento de su formación tiene lugar un trasiego de vesículas que van a dirigir su deposición a la zona del ápice del canal (Brewin, 1991). En el trabajo de Rae y col. (1992), el estudio inmunocitoquímico realizado en guisante, reveló la similitud en cuanto a composición de la pared celular radicular primaria y la del canal de infección, incluyendo componentes comunes como celulosa y pectinas. El canal queda rodeado de membrana, y en su interior, las bacterias van a quedar embebidas en la matriz glicoproteica anteriormente citada. Así, la progresión del canal irá transcurriendo gracias a la secreción de matriz y a las divisiones rizobianas que se producen en el ápice del canal.

Dentro de esta matriz glicoproteica del canal, el componente mayoritario es una glicoproteína de unos 95 kDa perteneciente a la familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, denominada AGPE (arabinogalactan protein extensin, en inglés), antes conocida como Root Nodule Extensin (RNE) o glicoproteína de matriz (MGP) (VandenBosch y col., 1989), y que es exclusiva de leguminosas (Rathbun y col., 2002). Esta extensina se acumula tanto en el lumen del canal de infección (Bradley y col., 1988), como en los espacios intercelulares y en las paredes celulares del tejido radicular en expansión (Rae y col., 1991), y es reconocida por un anticuerpo que se une a la parte glucídica de la molécula denominado MAC265 (VandenBosch y col., 1989). Si bien es secretada de manera constitutiva en raíz, su secreción aumenta en estadios tempranos del proceso infectivo (Rae y col., 1991), siendo capaz de unirse *in vitro* a la superficie bacteriana (Bolaños y col., 1996), lo que ha sugerido que pueda participar activamente en la regulación de la infección. Como se ha escrito, la producción de la AGPE también ha sido vinculada a respuestas de defensa tempranas. Se ha descrito tanto su sobreproducción ante mutantes rizobianos en el LPS bacteriano (Perotto y col., 1994), como su ensamblaje ante la presencia de hongos patógenos (Wojtaszek y col., 1995; Brady y Fry, 1997).

Dentro de la composición de la AGPE destaca la presencia de L-arabinosa, D-galactosa, ácido glucurónico, L-ramnosa y D-arabinosa, lo que hace que se incluya dentro del grupo

de las arabinogalactanoproteínas (AGP), entre las que se incluye la goma arábiga. De hecho, se sabe que los anticuerpos utilizados en la identificación de AGPE (MAC265, MAC204 y MAC236) dan reacción en más de un 90% con la goma arábiga en *Acacia senegal* (Fincher y col., 1983).

En general, las glicoproteínas tipo AGPE, contienen componentes tanto de las extensinas como de los arabinogalactanos (Goodrum y col., 2000), lo que además de dar significado a su nombre, explica que tengan mayor solubilidad que las extensinas, debido a la presencia de arabinogalactano (Gucciardo y col. 2005).

La AGPE es codificada por el gen *MtNI2* de *M. truncatula*, homólogo al gen *PsRNE1* de guisante. *PsRNE1* pertenece a una familia de genes de guisante que codifican glicoproteínas de distinto tamaño y con unidades estructurales repetidas de la misma composición. Cabe destacar la existencia de una secuencia altamente conservada C-terminal de 20 residuos en la AGPE de las distintas leguminosas, lo que denotaría su importancia funcional.

Si atendemos a su secuencia aminoacídica (Fig.7, Brewin 2004), observamos que I) los diez residuos de lisina (K, Lys) podrían explicar su posible unión a la superficie bacteriana cargada negativamente (Bolaños y col., 1996) al otorgar a la matriz carga positiva. II) Por otro lado, los residuos de tirosina (Y, Tyr) podrían ser responsables del ensamblaje o polimerización entre moléculas de AGPE (di-isoditrosina) o éstas con componentes de pared gracias a la presencia de peróxido de hidrógeno (Brady y Fry, 1997; Wisniewski y col., 2000; Gucciardo y col. 2005), como se detallará más adelante. III) Sus veintidós residuos de histidina (H, His), que normalmente aparecen en clusters, parecen involucrados en la complejación de iones de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) y níquel ( $\text{Ni}^{+2}$ ) de la matriz. IV) Sus once complejos serina-prolina (S-P, Ser-Pro) parecen portar las glicosilaciones de arabinosa. V) Y sus once residuos de hidroxiprolina (**P**) parecen ser los sitios de unión a los glicanos, que aparecen como sustituyentes.

NQYSYSSPPPPVHSPPPPKDPHHYSSPPPPPPPVHTYPH**PH**PVYHSPPPPVHTYPH**P**  
H**P**VYHSPPPPT**PH**KKPYKYPSPPPPPVHTYPH**PH**PVYHSPPPPT**PH**KKPYKYPSPPP  
PPPAHTYP**PH**V**P**T**P**VYHSPPPPAYSPPPPAYYYKSPPPPYHH

**Figura 7.** Secuencia aminoacídica de la AGPE (RNE1) extraída de Brewin 2004. En ésta se observan los sitios de glicosilación (SPPPP) así como los once puntos de unión de arabinogalactanos (**P**). Tanto el N-terminal (YSY) como el C-terminal (YYY) son puntos clave en el ensamblaje intermolecular, mientras que los residuos de tirosina (Y) jugarían un importante papel en el ensamblaje intramolecular por oxidación (Brady y Fry, 1997).

Uno de los aspectos de mayor interés en el estudio de estas glicoproteínas, es su posible interacción con la red de pectinas de pared durante el desarrollo del nódulo, como es el caso de la interacción con la pectina Ramnogalacturonano II (RGII). Esta pectina, caracterizada por ser un polisacárido de pequeño tamaño y presente en la pared celular primaria de plantas superiores, forma el ya comentado dímero gracias a los dos enlaces éster entre el borato y sus dos residuos de apiosa (dRG-II-B) (O'Neill y col., 1996). La molécula de RG II posee una estructura compleja y altamente conservada formada por un esqueleto de homogalacturonano, y también integrada por ácido D-galacturónico (GalU), ramnosa (Rha), arabinosa (Ara), galactosa (Gal) y pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes como apiosa, o ácido acérico (O'Neill y col., 2004).

Para poder comprender la posible interacción entre el componente glicoproteico y la pectina, es necesario tener en cuenta la presencia de especies reactivas de oxígeno en la luz del canal de infección. Estos compuestos van a ser responsables del ensamblaje de la glicoproteína con la implicación de distintos sistemas enzimáticos, peroxidasa (POD) y diamino oxidasa (DAO) (Wisniewski y col., 2000) o la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa de bacterias (Santos y col., 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) van a participar activamente en el proceso simbiótico. Los niveles de ROS parecen aumentar transitoriamente inmediatamente después de la percepción de los factores Nod por parte de la planta (Cárdenas y col., 2008), en lo que parece una señal dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), participando en el crecimiento, deformación y curvatura del pelo radicular (Peleg-Grossman y col., 2007). De hecho, la generación de ROS en el inicio del proceso simbiótico parece estar condicionada por la presencia de factores Nod compatibles (Gage, 2004; Santos y col.,

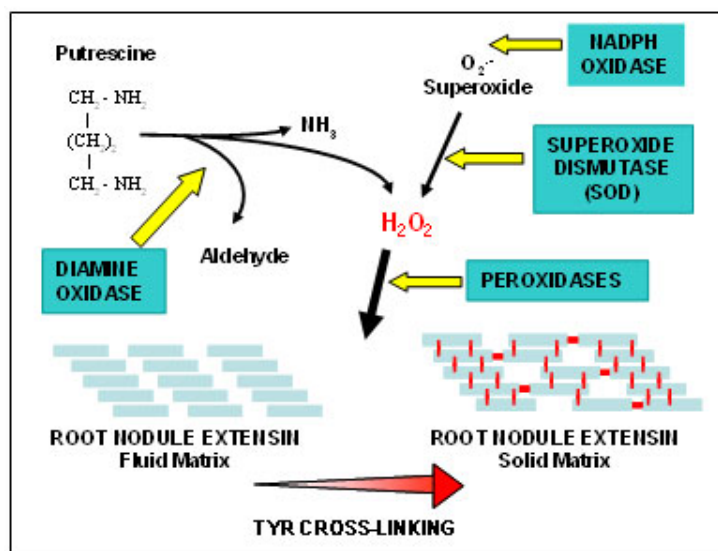
2001). Es importante tener en cuenta que el nivel de generación de ROS va a ser totalmente dependiente del momento del proceso simbiótico en el que nos encontremos, lo que explica la existencia de trabajos que contradicen la inducción de su generación, como el trabajo de Shaw y Long (2003), en el que se observa, en estadios muy tempranos tras la adición de factores Nod, una disminución en la generación de ROS vinculado a la supresión de respuestas de defensa por parte de la planta y a la deformación y curvatura del pelo radicular. Cabe destacar la posible acción de las ROS en la activación de un estado de alerta ante la presencia del microorganismo, como una respuesta preliminar de defensa que sería reprimida ante la bacteria compatible (Santos y col., 2001).

En cualquier caso, la participación positiva de las ROS en el proceso simbiótico parece innegable (Jamet y col., 2007), por su acción en el ensamblaje de componentes de pared, o bien por el papel que juega en la regulación de genes implicados en el proceso, tanto de la planta como de la bacteria, como es el caso de la regulación de *rip1* en *M. truncatula*, que interviene en la deformación del pelo y en la formación del canal (Ramu y col., 2002). También participan en la progresión del ciclo celular (Takahashi y col., 2004). Además, como se ha comentado, la generación de ROS es un mecanismo definido de respuesta de defensa de las plantas a la presencia de patógenos (Lamb y Dixon, 1997). La producción de ROS en la interacción planta-patógeno tiene lugar en dos fases: una, que ocurre de forma inmediata al contacto con el patógeno y que es transitoria, y la otra, que sucede a continuación, y provoca el estallido oxidativo masivo que culmina con una respuesta hipersensible que puede provocar muerte celular (Levine y col., 1994; Lamb y Dixon, 1997). También se ha relacionado su generación con el control de la infección dada su acumulación en canales abortados y en rizobios incapaces de nodular (Soto y col., 2009).

La DAO es una enzima que participa en el catabolismo de poliaminas, oxidando la putrescina y la cadaverina, dando lugar al correspondiente aldehído,  $H_2O_2$  y amonio (Smith y Barker 1988). Su actividad parece estar regulada por varios estreses (Maccarrone y col., 1991) y de ella, junto con la oxalato oxidasa del apoplasto (Brewin y col., 2000) y la NADPH oxidasa de membrana (Lamb y Dixon, 1997), depende el aporte de  $H_2O_2$  localizado en la zona del canal.

Otras enzimas generadoras de  $H_2O_2$  serían la SOD, que cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido a  $O_2$  y  $H_2O_2$ , y constituyen, junto con la ascorbato peroxidasa (APX), una de las defensas primarias de las células (bacterianas y vegetales) frente al estrés oxidativo (Becana y col., 2000). Éstas, parecen jugar un papel importante de protección durante el proceso simbiótico, siendo indispensables para un correcto establecimiento de la simbiosis. De hecho, los sistemas enzimáticos rizobianos, entre los que se encuentra la SOD, parecen indispensables para su supervivencia ante la presencia de peróxido de hidrógeno del canal (Santos y col., 2000).

Además del efecto protector frente al daño oxidativo, las peroxidasas van a participar activamente en el proceso infectivo rizobio-leguminosa por la alteración de la estructura de la pared celular en la zona de la raíz donde se producirá la entrada de la bacteria en la planta (Salzwedel y Dazzo, 1993). Las POD van a utilizar el  $H_2O_2$  liberado en el apoplasto, participando tanto en el otorgamiento de plasticidad a la pared celular, como en la insolubilización de la AGPE (Brownleader y col. 1997; Wisniewski y col., 2000). De acuerdo con el concurso de estos sistemas enzimáticos, y describiendo el modelo propuesto por Brewin (2004), en base a los trabajos precedentes, nos encontramos con que el lumen del canal es una matriz glicoproteica que va a ir ensamblándose progresivamente gracias a su contenido en Tyr, que constituiría el punto o los puntos de ensamblaje de la molécula, y a la presencia de peróxido de hidrógeno, existiendo un equilibrio entre el proceso de polimerización de la matriz (Herouart y col., 2002), que sería responsable del crecimiento del canal, y la acción del sistema enzimático encargado de eliminar los arabinogalactanos de la AGPE en ciertas condiciones de estrés (Brewin, 2004), que haría menos soluble a la glicoproteína, promoviendo su ensamblaje (Fig. 8). Como ejemplo de este equilibrio en la polimerización de la matriz, se pueden encontrar trabajos como el ya citado de Perotto y col. (1994), en el que se describen mutantes en el LPS bacteriano que provocan un desequilibrio que se traduce en la acumulación de matriz atrapando a las bacterias en el lumen del canal.



**Figura 8.** La acción de la Diamin Oxidasa (DAO) en la hidrólisis de poliaminas bacterianas, junto con la acción de la NADH oxidasa de membrana y la superóxido dismutasa (SOD), resultan en la generación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que se convertirá en el sustrato de la peroxiadasa (POD). La degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  llevaría al ensamblaje de la AGPE, permitiendo la progresión del crecimiento del canal de infección. Modelo propuesto por Brewin (2004).

En principio, la matriz glicoproteica formaría un fluido donde las bacterias son capaces de crecer y dividirse. El peróxido actuaría como elemento ensamblador de la glicoproteína, y su aporte quedaría determinado por la actividad de la diamin oxidasa (DAO) y la NADPH oxidasa. La distribución de los residuos de tirosina en la secuencia de la AGPE (Fig.7) indicaría el potencial para tres tipos de unión; I) La unión intramolecular que reforzaría a la propia matriz polimerizada; II) la conjugación entre el final de las moléculas, que permitiría la ampliación de la matriz; III) y el ensamblaje intermolecular que dependería del retiro previo de los bloques de AG (Gucciardo y col. 2005).

Tras el crecimiento del canal, y su progresión hasta llegar al primordio del nódulo, tiene lugar la invasión, que ocurrirá por un fenómeno de endocitosis. Este fenómeno es inusual en plantas, pues la existencia de pared impide el contacto entre agentes externos y la membrana plasmática. La bacteria va a introducirse en la célula vegetal, en cuyo interior tendrá lugar la diferenciación de la bacteria a la forma fijadora de nitrógeno o bacteroide. En plantas de nódulos indeterminados, como guisante, la endocitosis va a tener lugar desde las *gotas de infección*, que surgen en un determinado momento del desarrollo del canal en el que la matriz logra salir por un punto de ruptura de la pared (VandenBosch y col., 1989). En ese momento, se produce un contacto del rizobio con la

membrana plasmática vegetal (Rae y col., 1992) ocurriendo el fenómeno de endocitosis por invaginación de la misma. Ya en el interior celular, el rizobio quedará rodeado de la membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidea (mpb). En el caso de judía, el fenómeno de endocitosis tiene lugar en el ápice de los canales, a los que se les denomina “*infection pegs*” (en inglés, Brewin (1998)). En cualquier caso no todas las leguminosas van a endocitar a las bacterias en el momento previo a la diferenciación de bacteroides. En el caso de los rizobios que interaccionan con leguminosas del género *Andira* será en el mismo canal de infección donde se tornen a formas fijadoras de nitrógeno (de Faria y col., 1987).

El contacto entre el rizobio y la membrana va a estar condicionado por interacciones entre componentes del glicocalix de la membrana plasmática externa vegetal y de la superficie bacteriana. Glicoproteínas tipo lectina, como PsNLEC1, o glicolípidos como el reconocido por MAC206, van a estar implicados en la interacción con la superficie de las bacterias endofíticas (Bolaños y col., 2004b). Por su parte, los polisacáridos superficiales rizobianos, como el LPS bacteriano (Kannenberg y Carlson, 2001), ya descrito anteriormente, pueden ser necesarios en la interacción con la superficie de la membrana vegetal (Campbell y col., 2003), facilitando la interacción con la membrana gracias al aumento de hidrofobicidad que su modificación supone. Tras el contacto membrana-bacteria, el fenómeno de endocitosis tiene lugar, generándose una nueva estructura denominada *simbiosoma*.

En nódulos indeterminados, una vez formado el meristemo, las células del mismo irán diferenciándose tras las divisiones mitóticas, dando lugar a los diferentes tipos celulares que se encuentran en el nódulo. La zona infectiva (canales de infección) en desarrollo, queda localizada detrás del meristemo que se expande hacia el exterior (Fig.9). No todas las células meristemáticas van a ser infectadas, algunas de ellas van a especializarse formando una red intercalada entre células infectadas que conectará el tejido central del nódulo con los haces vasculares, por donde tendrá lugar el transporte de sustratos carbonados a las células fijadoras, y de éstas, los compuestos nitrogenados, al resto de la planta (Brewin, 1991). En general, la mayor parte de las células meristemáticas que van a ser infectadas, comienzan a sufrir un proceso de endoreduplicación (proceso de modificación del ciclo celular con la replicación del genoma (Fase S) sin la entrada en la fase de mitosis y citocinesis (Fase M)), gracias al cual, incrementan su volumen

nuclear y celular. Este fenómeno ocurre gradualmente en la zona de infección (Fig.9), donde el fenómeno de endorreduplicación puede cobrar mucha importancia en tanto en cuanto será responsable de crear el suficiente espacio dentro de la célula donde las bacterias se dividirán y diferenciarán a bacteroides. Uno de los genes implicados en este denominado fenómeno de endorreduplicación, es el gen *ccs52*, codificante de la proteína CCS52 que, en plantas, es responsable de la detención del ciclo celular y el paso a fenómenos de endorreduplicación previas al crecimiento y diferenciación celular. La expresión de este gen en nódulos de *Medicago* queda localizada en las zonas meristemática y de infección (Fig.9), donde se detiene la mitosis y se produce la diferenciación, respectivamente, pero no en la zona de fijación, donde las células ya aparecen diferenciadas.

Para el caso de nódulos determinados, como ya se ha descrito, las primeras divisiones ocurren en la hipodermis y a continuación, en células del periciclo y córtex interno, que terminan por fusionarse. La activación de la división celular requerida para la formación del primordio, va a cesar rápidamente, resultando en nódulos carentes de meristemo. Así, la diferenciación de las células infectadas tiene lugar de forma sincronizada y el nódulo maduro va a contener células simbióticas con una población homogénea de bacteroides activos. Existen, como en nódulos indeterminados, células intersticiales no infectadas que producen la enzima uricasa, encargada de producir ureidos que constituyen la forma nitrogenada que se suministrará a la planta en este tipo de nódulos (Kanebo y Newcomb, 1990).

En general, en ambos tipos de nódulos, se va a producir un crecimiento del tamaño de las células infectadas, que se traduce en un incremento en el crecimiento del nódulo que se produce gracias a dichos fenómenos de endorreduplicación que tienen lugar en las células. El estado de ploidía, además del incremento en tamaño, conlleva un aumento de la actividad metabólica y del contenido de orgánulos. La principal consecuencia del incremento del tamaño celular, es que permite contener numerosos bacteroides que se encargarán de fijar el nitrógeno atmosférico. La alteración del fenómeno de endorreduplicación, como se describe en algunos trabajos, puede traducirse en la pérdida de eficiencia del fenómeno invasivo y en el fallo en la diferenciación nodular, lo que va acompañado de una senescencia prematura y necrosis celular del rizobio y las células vegetales (Vinardell y col., 2003).



Como resultado de los procesos de invasión y diferenciación descritos, podremos distinguir las siguientes zonas o regiones en los nódulos indeterminados (Fig.9; Hirsch, 1992; Foucher y Kondorosi, 2000), así como la distinta tipología de bacteroides de acuerdo a la clasificación establecida por Vasse y col. (1990):

*Zona I:* es la zona meristemática, donde tiene lugar la proliferación o división de las células del nódulo.

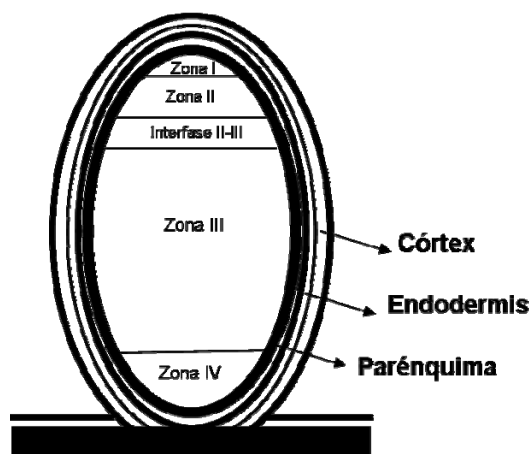
*Zona II:* corresponde a la zona de infección o invasión y a la zona de prefijación. La zona de invasión o infección se sitúa inmediatamente detrás del meristemo del nódulo. En ella, la división celular se ha detenido y la diferenciación de las células conlleva procesos de endoreduplicación que desembocan en un incremento del tamaño celular seguido de la invasión por los rizobios. Éstos aún poseen forma cilíndrica y pueden dividirse, denominándose bacteroides tipo 1. A continuación se sitúa la zona de prefijación, que contiene a los bacteroides tipo 2, algo más alargados que los de tipo 1, y donde las células simbióticas están más diferenciadas que en la zona de invasión.

*Interfase II-III:* es la zona que separa la zona de prefijación (II) y la de fijación (III), donde va a finalizar el proceso de diferenciación de las células vegetales. Se caracteriza por la acumulación de amiloplastos y la expresión de genes específicos de nódulo (transcritos de leghemoglobina, de genes *nif*,...), ligado al cambio metabólico que se produce, previo a la fijación de nitrógeno. En esta interfase aparecen bacteroides tipo 3, que han alcanzado su máximo tamaño y presentan una elevada heterogeneidad citoplasmática.

*Zona III:* es la zona de fijación, donde las células están totalmente diferenciadas. El tamaño de la célula será constante y éstas van a presentarse densamente empaquetadas conteniendo los bacteroides que realizarán el proceso de fijación de nitrógeno. Así mismo, se pueden distinguir dos regiones: una zona propiamente de fijación, en la que se han formado los simbiosomas tras el proceso de endocitosis, y en donde los bacteroides se diferencian a tipo 4 adquiriendo una forma característica, como en *Rhizobium leguminosarum*, que adquiere forma de “Y” o “T”, propia de bacteroides maduros, y otra, la zona ineficiente, donde las células vegetales no presentan tantos amiloplastos, probablemente consumidos durante la fijación, y que está compuesta por bacteroides tipo 5, que presentan un citoplasma homogéneo indicativo del inicio de la senescencia.

*Zona IV*: denominada *zona senescente*, aparece en nódulos con edad avanzada, para guisante, por ejemplo, a partir de la tercera semana, y en ella se encontrarán células y bacteroides degenerados. Esta zona irá expandiéndose a medida que avance la edad del nódulo.

Tanto en nódulos determinados como en indeterminados, existen tres tipos de tejidos que rodean al nódulo, que son, desde el interior al exterior, el córtex interno o parénquima, la endodermis y el córtex externo (Fig.9). Las diferencias aparecen en la ubicación de los tejidos vasculares pues, en nódulos indeterminados, el córtex interno se encuentra rodeando a los haces vasculares y a la endodermis vascular, mientras que en nódulos determinados, los haces vasculares estarán embebidos en el córtex interno (Hirsch, 1992). Los haces vasculares, conectados al sistema vascular radicular, constituirán la vía física de intercambio metabólico entre el nódulo y la planta.



**Figura 9.** Zonas o regiones en los nódulos indeterminados. La *zona I* corresponde a la zona meristemática, donde tiene lugar la proliferación o división de las células del nódulo. La *zona II* corresponde a la zona de infección o invasión e incluye también la zona de prefijación. La zona de invasión o infección se sitúa inmediatamente detrás del meristemo del nódulo. La *interfase II-III* es la zona que separa la zona de infección (II) y la de fijación (III), donde va a finalizar el proceso de diferenciación de las células vegetales. A continuación se ubica la *zona III*: es la zona de fijación, donde las células están totalmente diferenciadas. Por último, la zona más cercana a la raíz, correspondería a la *zona IV*, denominada *zona senescente*, y aparece en nódulos con edad avanzada, y en ella se encontrarán células y bacteroides degenerados. Esta zona irá expandiéndose a medida que avance la edad del nódulo.

### *Maduración del nódulo*

Se puede establecer que el proceso de maduración de simbiosomas constituye el inicio de la maduración del nódulo. Estas nuevas estructuras contienen bacteroides (bacterias

endofíticas) fijadores de nitrógeno, que quedan rodeadas del fluido peribacterioideo y de la llamada membrana peribacterioidea (mpb). En estas estructuras tendrá lugar un intercambio de nutrientes indispensable para la fijación de nitrógeno y en el que se verán implicados tanto la planta, aportando compuestos carbonados al bacterioide, como la bacteria, que aportará la fuente de nitrógeno necesaria para la planta. En este sentido, se ha de señalar que las dos tipologías de nódulos, determinados e indeterminados, presentan diferencias tanto a nivel metabólico (White y col., 2007) como en el desarrollo del simbiosoma (Mergaert y col., 2006).

La *membrana peribacterioidea* constituye una cubierta indispensable para el mantenimiento del simbiosoma, jugando un papel clave en la comunicación (señalización e intercambio de nutrientes) entre la planta y la bacteria, comunicación que recíprocamente será fundamental para su correcta formación y función. En general, se ha establecido que la función y estructura de la mpb va a cambiar según el estado de desarrollo en el que se encuentre el simbiosoma (Whitehead y David, 1997).

La formación de la mpb requiere de la producción de grandes cantidades de membrana, y en su interior quedarán contenidas las bacterias, lo cual hace que la formación de la mpb sea un buen modelo de biogénesis de membrana en plantas.

Aunque se ha descrito su similitud, por origen, con la membrana vegetal, e incluso con el tonoplasto, la mpb va a verse modificada debido al tráfico vesicular procedente tanto del aparato de Golgi como del retículo endoplasmático (Mellor, 1989), lo que permitirá, consecuentemente, el crecimiento de la misma. El fallo en la generación de nuevas vesículas, puede resultar en una degradación prematura del simbiosoma, y cualquier alteración en la mpb puede transformarla en un compartimento que funcionaría como un lisosoma donde las bacterias serían degradadas (Cheon y col., 1993).

Parte de los componentes que contienen las vesículas y que integrarán la mpb, son conocidos como nodulinas. Éstas, son proteínas expresadas específicamente en el nódulo. Dentro de las nodulinas más conocidas encontramos proteínas como la leghemoglobina (Wittenberg y col., 1974), la uricasa II y la glutamina sintasa II, implicadas en la asimilación de amonio (Bergmann y col., 1983; Cullimore y col., 1984) o la sacarosa sintasa (Thummler y Verma, 1987). Otras, como la nodulina-24, anclada a

la cara interna de la mpb, parecen estar implicadas en el reconocimiento y anclaje de los bacteroides a la mpb, lo que posibilitaría la sincronización de la división bacteriana y la síntesis de membrana (Verma, 1992).

La mpb va a jugar un importante papel en el mantenimiento del equilibrio del fluido peribacteroideo, indispensable para el mantenimiento del simbiosoma. Nodulinas como la nodulina-26, formarán canales que atraviesan la mpb, facilitando el transporte activo de metabolitos, como ácidos dicarboxilílicos, a través de la membrana al fluido peribacteroideo, desde donde serán utilizados por los bacteroides. En este sentido, las células no infectadas de los nódulos van a ejercer una importante función, pues en ellas tiene lugar la producción de dichos ácidos orgánicos que serán liberados al apoplasto, en nódulos indeterminados, o bien, como ocurre en nódulos determinados, transferidos a las células infectadas gracias al contacto existente entre ambas (Kavroulakis y col., 2000; White y col., 2007). En ambos casos serán incorporados al simbiosoma a través del transportador de dicarboxílicos.

Por otro lado, las vesículas con constituyentes que pasarán a formar parte de la mpb, también van a contener otros componentes proteicos como la  $H^+$ -ATPasa que pasará a incorporarse a la mpb y que juega un importante papel en el intercambio de nutrientes entre planta y bacteria y viceversa, lo que explicaría el incremento de su presencia en la mpb de nódulos maduros (Fedorova y col., 1999). La actividad de la  $H^+$ -ATPasa provoca una acumulación de  $H^+$  en el fluido peribacteroideo, que se traduce en un descenso del pH que el bacteroide va a combatir excretando el nitrógeno fijado en forma de amonio ( $NH_4^+$ ), a través de un transportador específico de la mpb, y ya en el citoplasma de la célula vegetal, el sistema GS-GOGAT (glutamina sintasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT)), lo incorporará como amonio y asparragina, en nódulos indeterminados, y ureidos, en nódulos determinados (Groat y Vance, 1982).

Cabe mencionar además, la reciente propuesta de un modelo sobre la implicación del ciclo de los aminoácidos en el proceso de interacción bacteroide-planta que va a dejar patente el control ejercido por ambos simbiosomas. Los bacteroides fijan nitrógeno que no transferirán al citosol de la planta si no es a cambio de un aminoácido, glutamato, y a su vez, la célula vegetal asimilará el amonio gracias a la donación de un aminoácido del

bacteroide, aspartato, para la síntesis de la asparragina (Lodwig, 2003; Prell y Poole, 2006).

El *fluido peribacteroideo* (fpb) es el material soluble existente entre bacteroide y la mpb. Es a él donde se liberan proteínas características de lisosomas, que explican la capacidad del simbiosoma de actuar como un orgánulo con propiedades líticas, cuando se produce un desequilibrio en el intercambio de metabolitos o por alteración de la estructura, de acuerdo con lo comentado anteriormente (Mellor, 1989; Cheon y col., 1993).

El fluido peribacteroideo posee una composición fundamentalmente glicoproteica, gracias a los aportes que provienen de la planta y de la bacteria (Fortin y col., 1985), muchas de las cuales son nodulinas. Se han caracterizado algunas glicoproteínas tipo lectinas, como la anteriormente mencionada PsNLEC 1, cuyas formas glicosiladas se secretan al fpb (Dahiya y col 1997), y aparentemente son imprescindibles para la diferenciación de bacteroides (Sherrier y col 1997; Dahiya y col. 1998).

El término *bacteroide* hace referencia a la forma simbiótica intracelular del microsimbionte. El trabajo de Vasse y col. (1990) recoge, en alfalfa, y como se ha descrito anteriormente, la distinta tipología en función de los distintos estados de desarrollo de los bacteroides durante la simbiosis (Tipologías 1, 2, 3, 4 y 5).

De la misma manera a lo que ocurre con las células vegetales, se ha descrito, únicamente para nódulos indeterminados de *Medicago sativa* y en *Vicia sativa*, que los rizobios sufren un proceso de diferenciación e incremento del tamaño celular que sugiere que los procariotas pueden utilizar la misma estrategia que los eucariotas en cuanto a la amplificación del genoma para su diferenciación e incremento del tamaño celular. El hecho de que este proceso esté condicionado por la ontogenia o tipología de nódulo, hace pensar en la existencia de factores de origen vegetal como reguladores de dicho proceso no existentes en todas las leguminosas (Mergaert y col., 2006).

En los bacteroides tendrá lugar el proceso de fijación de nitrógeno, por lo que los bacteroides requieren de un flujo de oxígeno suficiente como para que puedan llevar a cabo la respiración, pero en todo caso, se ha de mantener un bajo nivel,

aproximadamente de entre 3 a 22 nM de oxígeno libre (Witty, 1991; Hunt y Layzell, 1993), para que la nitrogenasa se mantenga activa. Esto se produce gracias a la acción de la leghemoglobina, una enzima capaz transportar oxígeno desde la membrana celular de los tejidos centrales del nódulo a los simbiosomas (Wittenberg y col., 1974). De hecho, ésta es la enzima mayoritaria en nódulos, y se denomina nodulina tardía porque aparece cuando el nódulo está morfológicamente constituido. Su presencia es imprescindible para que tenga lugar la fijación de nitrógeno.

La diferenciación del bacteroide en nódulos indeterminados, difiere respecto a lo que ocurre en nódulos determinados. En nódulos indeterminados, poco después de la liberación de las bacterias al citoplasma de la célula vegetal, se produce un proceso de diferenciación, que como se ha comentado, es similar al proceso de diferenciación de la célula vegetal (Mergaert y col., 2006). Durante la maduración del bacteroide, éste va entrar en un proceso de endorreduplicación que se traducirá en un incremento del tamaño de la bacteria, como ocurre en *Sinorhizobium meliloti*, e incluso en la adquisición de una forma característica de “Y” o “T” como ocurre en *Rhizobium leguminosarum*. Los bacteroides poliploides seguirán manteniéndose metabólicamente activos, pero perderán su capacidad de dividirse. Este bloqueo de la división bacteriana parece controlado por factores presentes en la planta (Mergaert y col., 2006). Por el contrario, en nódulos determinados, los bacteroides mantienen, como en vida libre, su contenido genético, tamaño y capacidad de dividirse.

### *Senescencia del nódulo*

En general, el proceso de senescencia puede ocurrir de forma natural en el nódulo, de forma prematura debido a la acción de distintos estreses (Matamoros y col., 1999) o por el fallo en la comunicación entre ambos simbiosomas (Banba y col., 2001).

En nódulos determinados, el proceso de senescencia comienza en la zona central del nódulo, extendiéndose hacia el exterior, mientras que la senescencia en nódulos indeterminados comienza en la denominada Zona IV o de senescencia, extendiéndose posteriormente al resto del nódulo en dirección meristemática.

Parece que el control y regulación de la senescencia, guarda un paralelismo con el proceso de control y regulación del número de nódulos, basándose en la acción de hormonas y otros metabolitos (ácido abscísico, auxina, citoquininas, etileno, ácido giberélico, óxido nítrico, ROS, ácido jasmónico, ácido salicílico, uridinas, flavonoides y los factores Nod) (Lodwig y col., 2003; Ferguson y Mathesius, 2003; Oldroyd y col., 2001).

El proceso de senescencia va a provocar una serie de cambios en el nódulo, algunos de ellos fácilmente reconocibles, como el cambio de coloración de rosa a verde, por oxidación del grupo hemo de la leghemoglobina (Roponen, 1970). Por otro lado, a nivel ultraestructural, tienen lugar una serie de cambios en el simbiosoma, que se traducen en una modificación de su forma y tamaño, y en la desintegración de su membrana (Puppo y col., 1991; Timmers y col., 2000). También aparecen cambios en cuanto a composición y estructura de orgánulos se refiere, como el incremento en la presencia de peroxisomas.

Asimismo, durante el proceso de senescencia, van a aparecer fenómenos de degradación proteica por actividad proteolítica (Pladys y Vance, 1993), proveniente de la planta, incluyendo enzimas pertenecientes a la familia de cisteín proteasas (CPs), algunas con función similar a las caspasas de animales, partícipes en la muerte celular programada (Kardailsky y Brewin, 1996).

Con todo, cabe señalar que el fenómeno de senescencia natural va a tener características propias que difieren del proceso de senescencia prematura producida por diferentes estreses. Un ejemplo de ello, sería la reducción de la capacidad fijadora de nitrógeno respecto a la disminución de leghemoglobina, que en la senescencia natural se produce de forma simultánea, mientras que en procesos de senescencia prematura la disminución de la capacidad de fijación es previa al decrecimiento de la leghemoglobina (Puppo y col., 2005).

Además del incremento en la actividad proteolítica, el proceso de senescencia va acompañado de un aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno, que desencadena un estrés oxidativo en nódulos (Evans y col., 1999; Loscos y col., 2008). El daño oxidativo provocado por las ROS en el nódulo debido a la aparición del fenómeno de senescencia, o por la existencia de una respuesta de defensa de la planta,

estará condicionado por la acción de antioxidantes (como el ácido ascórbico o el glutatión) y la regulación hormonal (como el ABA).

La generación de ROS durante el proceso de senescencia está vinculada a la degradación de ácidos grasos, a las condiciones reductoras que de por sí se dan durante el proceso de fijación de nitrógeno (Dalton y col., 1991), a la propia acción de la leghemoglobina (Moreau y col., 1996; Becana y Klucas, 1992a), o a la presencia de hierro libre citosólico (Becana y Klucas, 1992b).

Como se ha descrito, las ROS, van a estar relacionadas con antioxidantes como el ascorbato o el glutatión. Ambos antioxidantes disminuyen su presencia al comienzo del proceso de senescencia, desencadenando un incremento en las ROS, y consecuentemente, del daño oxidativo característico del proceso de senescencia. El ascorbato va a estar implicado, entre otros, en la síntesis de hormonas, en expresión génica, en el crecimiento y división celular, en incrementos de la actividad nitrogenasa, en el control del daño oxidativo o en el retraso de la senescencia. Por otro lado, el glutatión, además de su participación en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, va a ejercer un importante control del proceso de senescencia (Puppo y col., 2005). Todo ello revela las importantes implicaciones que estos dos componentes tienen durante el proceso de senescencia.

Una de las enzimas implicadas en el ciclo antioxidante ascorbato-glutatión es la ascorbato peroxidasa (APX), cuya principal función, ya descrita anteriormente, es la detoxificación del peróxido de hidrógeno, y cuyo contenido, principalmente en el citoplasma de las células infectadas, va a disminuir en el proceso de senescencia del nódulo (Matamoros y col., 1999).

De manera generalizada, se ha establecido que el desarrollo de la senescencia en el nódulo es resultado de una reducción del sistema antioxidante ascorbato-glutatión comentada que desencadena una disminución en la ratio C/N dentro del nódulo (Loscos y col., 2008; Puppo y col., 2005). A su vez, se desencadenaría una señalización mediada por ácido abscísico (ABA) resultando en la activación de la proteólisis anteriormente comentada (Puppo y col., 2005), y en la aparición del proceso senescente. Bajo estas condiciones, los bacteroides se encontrarían expuestos a condiciones líticas que, de



acuerdo con algunos trabajos, podrían conducir a un revestimiento de su diferenciación a la forma de vida libre (Müller y col., 2001).

Como resultado del proceso de senescencia tiene lugar la muerte de la célula hospedadora y del microsimbionte (Van de Velde y col., 2006), a pesar de trabajos, como el citado de Müller y col. (2001) o el de Hernández-Jiménez y col. (2002), que mantienen que los bacteroides revierten su diferenciación, pudiendo sobrevivir al fenómeno de senescencia. También se ha descrito la posible aparición de un fenómeno de muerte celular programada, desencadenado probablemente como consecuencia del daño oxidativo producido sobre las mitocondrias, y relacionado con la inducción de las ya comentadas cisteín proteasas (Alesandrini y col., 2003).

Este proceso senescente en nódulos, mantiene un paralelismo con el proceso de senescencia que acontece en hojas (incremento del número peroxisomas, participación de hormonas como el ABA y el etileno, activación de cisteín proteasas...) pese a que el proceso senescente en hojas, a diferencia de lo que ocurre en nódulos, es reversible (Van de Velde y col., 2006)

En sí, la senescencia del nódulo es un proceso complejo cuyo desencadenante, hoy por hoy, es desconocido.

### **3.1.2 La simbiosis como modelo para el estudio de la funcionalidad del boro**

El proceso simbiótico rizobio-leguminosa fue uno de los primeros sistemas biológicos en donde se analizó la influencia del B. Los ensayos realizados en plantas de *Vicia faba*, permitieron establecer una relación entre el micronutriente y el proceso de nodulación al observarse que, en condiciones de deficiencia del micronutriente, existía un descenso en número y tamaño de los nódulos, que fue atribuido a un déficit del aporte de fotosintatos hacia la raíz debido a la alteración estructural de los haces vasculares de la planta (Brenchley y Thornton, 1925). Sin embargo, a pesar de este estudio preliminar, las investigaciones que llevaron a establecer una esencialidad específica del B sobre el proceso de simbiosis en sí, no se abordaron hasta finales del siglo pasado.

El análisis del contenido del micronutriente mostró que en el nódulo, se producía una acumulación elevada de boro en comparación con el resto de tejidos de la planta, lo que explicaba que los requerimientos del micronutriente fueran más acusados en plantas inoculadas que en aquellas crecidas en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (Gárate y col., 1993). Esto explicaría a su vez el elevado requerimiento del nutriente bien para el desarrollo de dicho órgano, lo que le convierte en una estructura vegetal ideal para el análisis de su función, bien sobre el proceso de fijación de nitrógeno en sí. Sin embargo, ningún estudio hasta el momento relaciona directamente al micronutriente con la actividad nitrogenasa.

Así, en organismos fijadores en vida libre y en aerobiosis, como cianobacterias del género *Anabaena*, el B resulta esencial para el mantenimiento de la integridad estructural de la cubierta del heterocisto (Bonilla y col., 1990; García-González y col., 1991). Sin embargo, cuando *Anabaena* crece en microaerobiosis o en presencia de una fuente continua de nitrógeno (Mateo y col., 1986; García-González y col., 1988), la deficiencia de B no afecta el proceso de fijación de  $\text{N}_2$ . La alteración de dicha cubierta del heterocisto, supone una desestabilización de la barrera que controla la difusión de oxígeno, lo que, además de afectar al propio proceso de fijación, termina resultando en una alteración del resto de funciones de la cianobacteria.

Durante las dos últimas décadas, los estudios llevados a cabo sobre el papel desempeñado por el boro en el proceso simbiótico han demostrado que, nódulos desarrollados bajo condiciones deficientes en B no son funcionales y parecen desarrollar una senescencia prematura, mostrando una degeneración de las paredes y membranas celulares y una reducción en la capacidad de fijación de nitrógeno de los bacteroides, que culmina con la necrosis generalizada de la planta (Bolaños y col., 1994).

Estas alteraciones estructurales se producen tanto en nódulos indeterminados de guisante (Bolaños y col., 1994) como determinados de judía, en los que además se ha demostrado que la presencia de boro es indispensable para el correcto ensamblaje de proteínas de pared (Bonilla y col., 1997a).

En cualquier caso, las alteraciones estructurales que aparecen en el nódulo también van a estar presentes en otros tejidos como se ha indicado en apartados anteriores, si bien en

nódulos, la integridad estructural del órgano es absolutamente crítica para su funcionalidad, ya que en ella radica el mantenimiento de la barrera de difusión de oxígeno.

Ahondar en el efecto estructural del B, expuesto al inicio de este punto, resulta interesante para comprender algunos de los efectos producidos por la deficiencia sobre la estructura de los nódulos. También lo es el análisis del papel del boro en la biogénesis tanto de la pared celular como de la membrana plasmática vegetal. En membrana plasmática, el B parece intervenir en la estabilización de sus componentes. De hecho, como se describió inicialmente en la introducción, existen trabajos en los que se muestra, entre otros, que la inhibición del gradiente de  $H^+$  en ausencia de boro culmina en un aumento de rigidez de la misma (Ferrol N. y col., 1993).

En pared, el boro va a intervenir en su biogénesis (Cohen y Lepper, 1977; Goldbach y col., 1991), donde aparecerá como elemento de anclaje entre las dos moléculas de ramnogalacturonano II (O'Neill y col., 2001). Así, la estabilidad de la pared celular va a depender de la presencia del micronutriente, que permitirá la formación de dímeros entre dichas moléculas estableciéndose una red tridimensional en la pared, que determinará las propiedades mecánicas de la misma.

Las alteraciones estructurales como efecto de la deficiencia de B en pared, también fueron estudiadas a nivel molecular en el sistema simbiótico *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli*, en cuyos nódulos desarrollados bajo condiciones deficientes de B, a pesar de expresarse el gen que codifica para la glicoproteína ENOD2, ésta no fue detectada (concretamente en el córtex interno), debido a un fallo en el ensamblaje de la misma, que se tradujo en una anormal acumulación citoplasmática (Bonilla y col., 1997a). La ENOD2 es una glicoproteína rica en hidroxiprolina, perteneciente familia de las HRGPs (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina), a la que también pertenece la anteriormente descrita glicoproteína AGPE, reconocida por MAC265. En condiciones normales, las HRGPs se acumulan preferentemente en paredes celulares de células infectadas y en membrana peribacteroidea (Benhamou y col., 1991), y parecen ejercer un importante control en la difusión de oxígeno a través del córtex interno. Así pues, son constituyentes fundamentales en la remodelación de la pared celular durante el inicio del desarrollo del nódulo y del canal de infección. Además de la ENOD2, en ese

mismo estudio se determinó la disminución de hidroxiprolina en condiciones deficientes, cuya síntesis se ve incrementada en condiciones normales durante los estadios tempranos de nodulación, localizándose en la zona central y del córtex del nódulo (en su pared, como parte de las HRGPs). Con todo, se puede afirmar que la deficiencia de boro lleva asociada la disminución en la proporción de moléculas ensambladas en pared, lo que provocaría el efecto estructural característico de la deficiencia en los distintos tejidos vegetales: la reducción de la elasticidad de pared (Findelee y Goldbach, 1996) y la pérdida de porosidad de la misma (Fleischer y col., 1999). Si además atendemos al contenido proteico, en la pared del nódulo encontramos un contenido mayor respecto al existente en la pared de las células de raíz (Frueauf y col. 2000), lo que explicaría la aparición de alteraciones más severas en nódulos deficientes de B respecto a las de otros tejidos desarrollados bajo deficiencia, como el radicular, en tanto en cuanto el papel del B se relaciona con la estabilización de sus componentes.

Otros trabajos también han descrito una distribución anómala de pectinas en la pared de células del nódulo, tanto en nódulos determinados (Bonilla y col., 1997b) como indeterminados (Redondo-Nieto y col., 2003). Concretamente, el estudio ultraestructural de distintas pectinas de pared (ácido poligaracturónico y el ramnogalacturonano II), bajo condiciones de deficiencia de B en nódulos de guisante, recogido en el trabajo de Redondo-Nieto y col. (2003), reveló la existencia de alteraciones en la estabilidad de las mismas en la pared celular, y su acumulación en el citosol, de acuerdo al esquema anteriormente expuesto ya descrito por los estudios previos sobre el papel del B en la biogénesis y estabilidad de la pared. Por ello, de acuerdo con lo propuesto por Goldbach (1997), parece razonable establecer que la privación de B puede generar un fallo en la fusión de vesículas provenientes del Golgi, lo que daría sentido a la acumulación del material proteico en el citoplasma de la célula. Precisamente en este modelo, se propone al B como elemento de unión entre grupos hidroxílicos, preferentemente entre manosas, gracias a lo que se lograría el contacto vesícula-membrana, y su posterior fusión estable para la consecución de la liberación del material contenido en la vesícula.

El fallo vesicular que tendría lugar bajo deficiencia de B, explicaría además de la falta de glicoproteínas y pectinas de pared, otros efectos como la degeneración de la mpb y la

aparición de una estructura anómala del bacteroide (Bolaños y col., 1994). Como se detalló en el apartado anterior, durante la formación de la mpb, pareja a la diferenciación del bacteroide, la célula vegetal va a producir glicoproteínas que se integrarán en la misma. Tal es el caso de la glicoproteína similar a lectinas denominada PsNLEC1 (Dahiya y col., 1997), que contiene 3 isoformas (A, B y C) localizadas en simbiosomas, y que son indispensables para la diferenciación de bacteroides. De manera similar a los efectos producidos por la mutación de las isoformas A y B de dicha glicoproteína (Dahiya y col., 1997), la deficiencia de B produce una alteración en la glicosilación de las isoformas A y B, de acuerdo con lo obtenido en el reconocimiento del anticuerpo frente a la parte glucídica, además de una alteración en la fusión vesicular, como revela la acumulación de PsNLEC1 en el citoplasma, lo que se relacionaría con la característica formación de simbiosomas aberrantes no funcionales (Bolaños y col., 2001).

Por otro lado, además de estar implicado en la formación de la estructura, el boro va a condicionar la interacción de la bacteria con la matriz glicoproteica del canal y con el glicocalix de la membrana peribacteroidea. La presencia del micronutriente inhibe la asociación *in vitro* de la matriz glicoproteica con la bacteria, lo cual, trasladado al nódulo, podría significar que en presencia de B se permitiera la progresión del rizobio a través del canal. A su vez, el B promovería la interacción con la membrana plasmática vegetal, interviniendo en el fenómeno de endocitosis previo a la invasión (Bolaños y col., 1996). Esto explicaría, en parte, la alta tasa de canales abortados y la baja infección que presentan los nódulos deficientes en B (Bolaños y col., 1996; Redondo-Nieto y col., 2001). De acuerdo con estos resultados, la deficiencia de B resultaría en un conjunto de efectos de características similares a lo que ocurre con mutantes en polisacáridos superficiales, en los que tanto el desarrollo del canal de infección, como la invasión bacteriana o el desarrollo de simbiosomas aparecen alterados en una forma similar a la descrita (Perotto y col., 1994).

Como se ha explicado, la deficiencia de B va a reducir tanto en número como en tamaño, la capacidad de nodulación. Esto sin duda, está ligado a un fallo en el reconocimiento inicial planta-bacteria, que, como se detalló, ha de estar finamente regulada para una correcta consecución de la interacción simbiótica. De hecho, se ha descrito que en las etapas iniciales de la interacción planta-bacteria, en deficiencia de B,

existe una afección en la inducción de los genes *nod*. Esto está relacionado con la alteración en la composición de los exudados secretados por las raíces de las leguminosas crecidas bajo deficiencia de B. El B constituye un elemento clave en el metabolismo de fenoles, que son los precursores de los flavonoides. La ausencia del micronutriente va a activar el metabolismo de la fenilalanina amonio liasa (PAL) que conducirá a un incremento de los compuestos fenólicos. Al mismo tiempo que tiene lugar la inducción de esta enzima, tiene lugar el incremento de otros sistemas enzimáticos como la polifenol oxidasa, que se encargarán de la oxidación de fenoles a quinonas (Cakmak I. y Römheld, 1997; Ruiz y col., 1998). Consecuentemente, la síntesis de flavonoides se ve afectada, lo que lleva asociado una disminución en la inducción de los genes *nod*, que conlleva la reducción de la curvatura del pelo radicular y del establecimiento del canal preinfectivo (Redondo-Nieto y col., 2001).

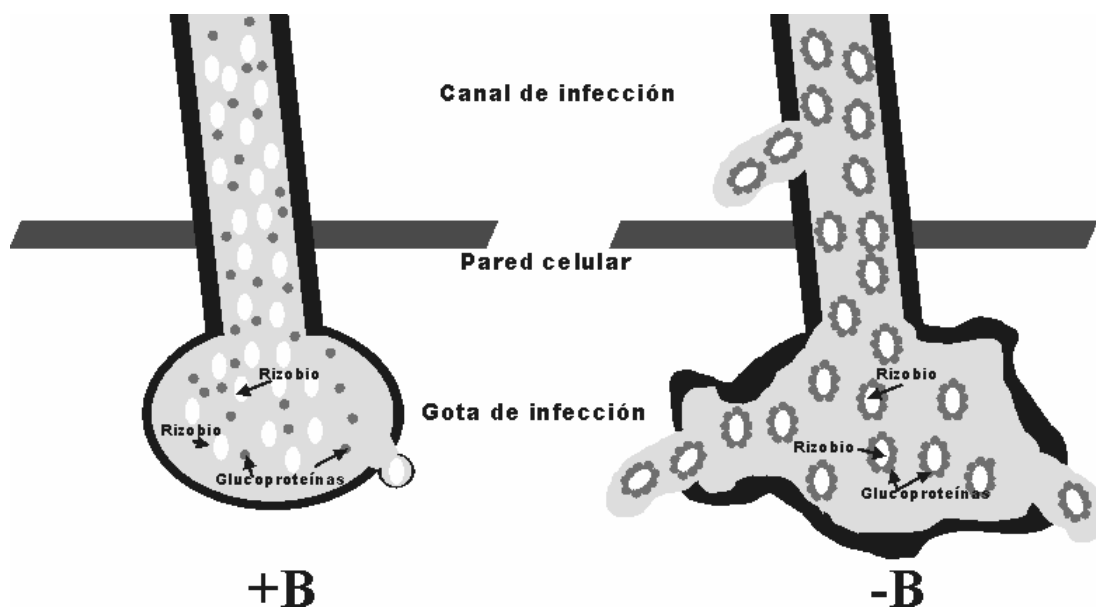
Por otro lado, y ligado a lo anterior, la generación de quinonas pueden producir la generación de especies reactivas de oxígeno que resulten en un daño oxidativo (Cakmak I. y Römheld, 1997) que también se ha descrito como efecto de la deficiencia de B en cultivos celulares (Koshiba y col., 2009).

Otro de los procesos de la etapa de preinfección que se ven mermados en condiciones de carestía del micronutriente, es la adsorción bacteriana a las paredes radicales (Redondo-Nieto y col., 2001), posiblemente debido a la alteración de los componentes de las mismas en deficiencia de B.

La coexistencia de la inhibición de la adsorción bacteriana y en la inducción de genes *nod*, claves en el proceso preinfectivo, explicaría la implicación del B en la regulación de la nodulación en las etapas iniciales del proceso.

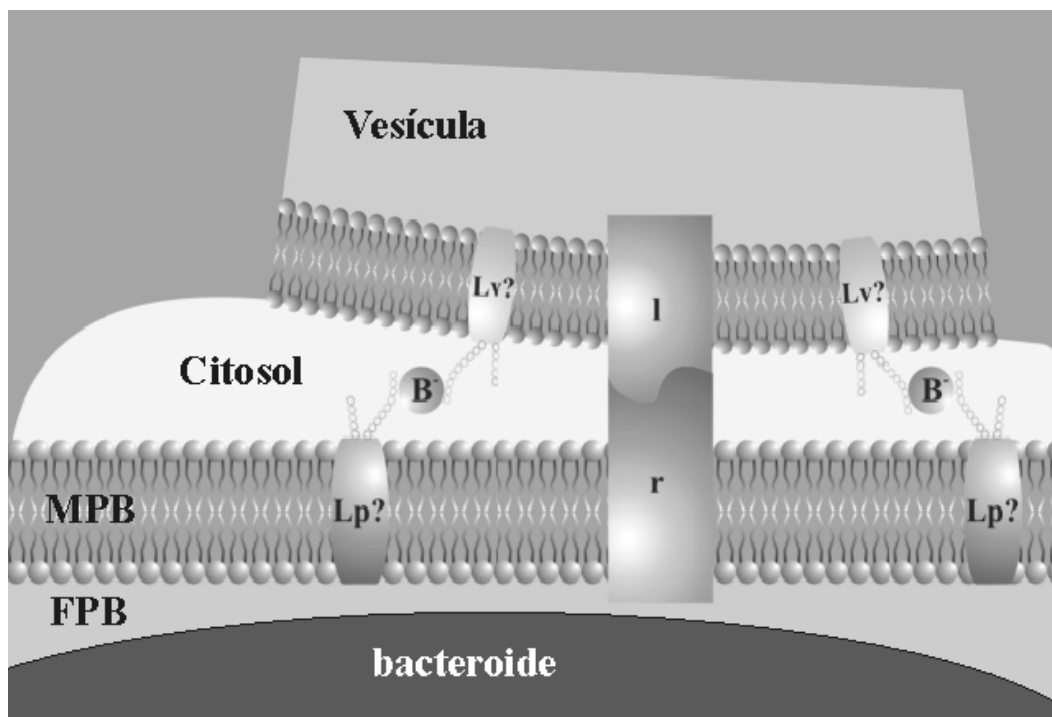
Siguiendo la secuencia de acontecimientos que se producen durante la formación del nódulo, tras la progresión bacteriana a través del canal de infección, como se ha comentado, en ausencia de B, se va a producir un acumulo del material glicoproteico, que se adhiere a la superficie bacteriana, impidiendo su progresión (Bolaños y col., 1996). Esto explicaría por qué, en condiciones de deficiencia de B, los canales de infección abortan en el pelo radicular. Las bacterias seguirían dividiéndose provocando

un engrosamiento del mismo y la presión ejercida por las bacterias sobre la pared debilitada del canal, daría lugar a su ruptura posterior abortamiento (Fig 10).



**Figura 10.** Modelo de infección por rizobios e invasión celular. En condiciones control (parte izquierda de la figura, +B), los rizobios progresan a través de la matriz glicoproteica del canal de infección gracias a que el B actúa inhibiendo la interacción de la AGPE a la superficie bacteriana (Bolaños y col., 1996), por el contrario, en condiciones de deficiencia (parte derecha de la figura, -B), la matriz glicoproteica quedaría adherida a la superficie bacteriana, impidiendo la progresión bacteriana y la invasión normal por endocitosis. *Extraída de Bonilla y col. (2006)*

Tras el proceso de invasión, va a tener lugar la formación de una nueva estructura mixta denominada simbiosoma, cuya formación y desarrollo han sido descritos en el punto anterior. Muchas de las glicoproteínas simbiosomales van a ser ricas en grupos *cis*-diol, y por tanto, van a ser susceptibles de interaccionar con B. En ausencia del micronutriente, los simbiosomas van a presentar una mpb muy degradada y bacteroides indiferenciados, lo cual, como se ha detallado, podría estar relacionado con una alteración de la fusión vesicular debida a la modificación que sufren, en cuanto a competentes glicoproteicos se refiere, las membranas (Fig. 11). Entre otros, el fallo en la glicosilación de glicoproteínas como PsNLEC1 bajo deficiencia de B se traduce en una inhibición del proceso de maduración de toda la estructura simbiosomal.



**Figura 11.** Modelo hipotético del papel del B en el proceso de fusión de vesículas durante la diferenciación de simbiosomas. El B actuaría estabilizando componentes de membrana y además, actuaría como ligando entre glicoproteínas de la membrana de la vesícula (Lv) y de la membrana peribacterioide (mpb) (Lp), facilitando el proceso de fusión. (Lv) Glicoproteínas de membrana de vesícula; (Lp) glicoproteínas de membrana peribacterioide; (l) ligando de membrana de la vesícula; (r) receptor de la membrana peribacterioide. *Extraída de Bonilla y col. (2006) y adaptado de Goldbach (1997).*

Además de los efectos descritos, se ha establecido que la deficiencia de B tiene incidencia en el patrón de expresión de determinados genes, en concreto, durante el desarrollo de la nodulación, la expresión de más del 60% de los genes de *Medicago truncatula* está afectada en deficiencia del micronutriente. La tesis doctoral de Redondo-Nieto (2002), detalla ciertos aspectos de gran importancia en este sentido, entre ellos, que la deficiencia de B puede disminuir la traducción de ciertos transcritos de ARN, lo que provocaría una disminución del producto final que acabaría por incrementar los niveles de transcripción del gen, a modo de retroalimentación (“feedback”, en inglés). En esta misma línea, se ha establecido que existen alteraciones en el patrón de sedimentación de las muestras ribosomales de plantas crecidas bajo deficiencia de B (Borshchenko, 1970). Asimismo, en deficiencia de B existe una disminución del número de polisomas debido al aumento de la actividad ribonucleasa (Chapman y Jackson, 1974). Todo ello induce a pensar que en condiciones de deficiencia de B, existe un fallo general a nivel traduccional quizá por la alteración de la actividad ribosomal. En cualquier caso, además de las alteraciones transcripcionales y



traduccionales descritas en deficiencia de B, existen alteraciones post-traduccionales, como las descritas durante la glicosilación de PsNLEC1. En conjunto, todo ello resultaría en una alteración del patrón proteínico, que hace del B un elemento con importancia potencial en los mecanismos de señalización y regulación celular.

Un aspecto interesante a este respecto, es el efecto que la adición de un suplemento de  $\text{Ca}^{+2}$  tiene en la recuperación de la expresión de ciertos genes reprimidos en ausencia de B (Redondo-Nieto y col, 2002; Bonilla y col, 2006). La relación entre estos dos nutrientes ha sido descrita en numerosos estudios, y entre otros, su adición en plantas deficientes de B, parece aminorar los efectos sobre la nodulación (Redondo-Nieto y col., 2003). El hecho de que el calcio bajo deficiencia de boro, tienda a disminuir su presencia en membrana coincidiendo con su acumulación en el apoplasto de la célula (Mühling y col., 1998), se relaciona con su falta de disponibilidad en procesos relacionados con transducción de señales y con el control de factores de transcripción, de aquí su posible acción en la recuperación de la inducción de ciertos genes tras su adición durante la ausencia de B (Rudd y Franklin-Tong, 2001). Recíprocamente, se ha demostrado que la aplicación de ácido bórico bajo deficiencia de calcio, aminora ciertos efectos (Bonilla y col., 1995) e incide sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol y entre otros, puede actuar inhibiendo la proliferación celular en ciertos cánceres humanos (Barranco y col. 2008).

Relacionado con este aspecto, otra consecuencia de la deficiencia de B en la expresión génica, es la alteración de la regulación del ciclo celular. Esto está vinculado con el mayor requerimiento del micronutriente en tejidos en crecimiento respecto a los requerimientos del mismo en tejidos maduros. Además, como se ha descrito, el nódulo es un órgano cuyo contenido en B respecto a otros tejidos es mayor, por ello los efectos provocados en él por la deficiencia son más acusados. Si además atendemos a su desarrollo, el nódulo, tanto indeterminado como determinado, va a constituir un modelo en donde la diferenciación celular y la organogénesis, en condiciones deficientes, van a verse afectadas. De hecho, nódulos deficientes de guisante y alfalfa, presentan un tamaño menor que los nódulos control, lo que parece relacionarse con una disminución del volumen celular más que por la reducción en el número de células, junto con un problema en la diferenciación de las distintas zonas de desarrollo, de tal forma que las células de los tejidos internos de nódulos deficientes en B, aparecen con un aspecto

típico de células indiferenciadas (Reguera y col., 2009). El análisis de la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular durante la organogénesis del nódulo, mostró que, en condiciones de deficiencia de B, la actividad mitótica no disminuía, de acuerdo con la expresión de *cycD3*, implicado en la reactivación del ciclo celular en respuesta a los factores Nod (Foucher y Kondorosi, 2000). Sin embargo, la actividad del gen *ccs52a*, implicado en la detención del ciclo celular y transición del ciclo mitótico a ciclos de endorreducción (Cebolla y col., 1999), fue prácticamente nula bajo deficiencia de B (Reguera y col., 2009). La expresión de este gen, además, es requerida para el inicio del programa de diferenciación celular (Vinardell y col., 2003). *Ccs52a* codifica un activador del denominado Complejo Promotor de la Anafase (APC), que interviene en la ubiquitinación de ciclinas mitóticas previa degradación en el proteasoma, provocando la inactivación de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) mitóticas (Kondorosi y col., 2005). Así, el complejo no se activaría en deficiencia de B, con el consiguiente fallo en la degradación de ciclinas, que impediría el cese de la actividad mitótica, provocando una alteración del proceso de endorreducción, lo cual se ha demostrado que conduce a una menor tasa de poliploidía en células de nódulos deficientes en B (Reguera y col., 2009).

### **3.2 Pez cebra como modelo para el estudio de la funcionalidad del boro en animales**

Como ya se ha señalado, desde hace años se viene proponiendo un papel del B más allá de la pared celular en plantas, lo que ha hecho que su estudio se extienda a animales, entre ellos, anfibios (Fort y col., 1999), peces (Eckhert, 1998, 1999), roedores (Dupre y col., 1994), pájaros (Hunt, 1989) e incluso seres humanos (Nielsen, 1996), pero existe un importante condicionante en el análisis de los efectos que su deficiencia causa, dada la dificultad que lleva implícita su “retirada” en ciertos sistemas biológicos.

Es por esto que organismos como *Danio rerio*, desarrollado en sistemas acuáticos, donde es relativamente asequible lograr un contenido mínimo de B, supone un sistema biológico con numerosas ventajas y del que se tiene un conocimiento cada vez mayor. Esto se debe precisamente a que, desde hace años, son numerosos los trabajos que

utilizan al “Zebrafish” (*Danio rerio* o pez cebra) como modelo para el análisis del desarrollo a nivel genético en vertebrados.

Aunque tradicionalmente se ha utilizado al ratón como modelo en estudios genéticos, existe una importante limitación por la dificultad del análisis de las etapas correspondientes al desarrollo embrionario junto con el alto coste que su mantenimiento requiere. Es por esto que se ha propuesto al pez cebra como modelo alternativo en vertebrados para estudios de desarrollo.

Entre las principales ventajas que este organismo ofrece, se encuentran (Streisinger, 1981):

- Alta tasa de fecundidad (cientos de huevos en intervalos cortos de tiempo).
- Un corto periodo de generación (2-4 meses).
- Un rápido desarrollo
- Una fertilización externa.
- Embriones translúcidos, lo que permite analizar el estado de desarrollo mediante microscopía óptica de una manera fácil y rápida, a tiempo real y evitando el análisis invasivo del embrión.
- Un fácil mantenimiento. Son organismos de pequeños tamaño (no más de 2,5 cm en estado adulto), por lo que se puede mantener un número elevado de individuos en un espacio no muy grande.

Precisamente su rápido desarrollo puede determinar que, si el B juega un papel importante en él, aparezcan claros efectos de deficiencia en unas horas. Además, su alta tasa de fecundidad permite obtener, de forma rápida, suficiente material para estos estudios, y el carácter traslúcido de sus embriones facilita la observación de anomalías morfogénicas.

### 3.2.1 Desarrollo del pez cebra

El pez cebra es un organismo de agua dulce localizado en ríos del norte de India, Nepal y sur de Asia.

Es un teleósteo (pez óseo) diploide cuyo patrón de desarrollo embrionario es muy similar al de mamíferos, incluyendo el desarrollo embrionario de seres humanos. A diferencia de los modelos animales invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (nematodo) o *Drosophila* (mosca), sus características difieren menos respecto al desarrollo de mamíferos.

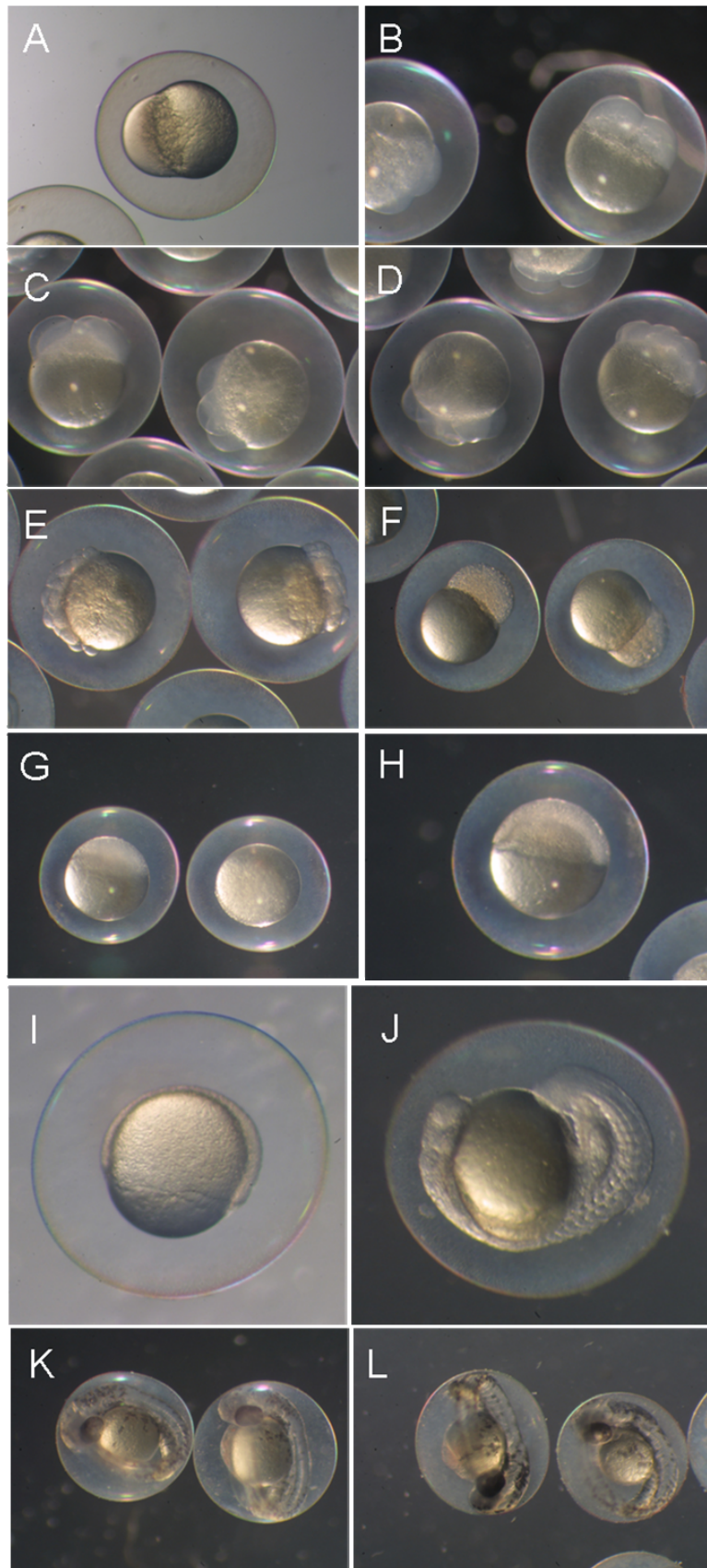
Como se ha escrito, el desarrollo del pez cebra es rápido, encontrando en tan sólo 24 horas post-fertilización los principales órganos internos formados, y en 48-72 horas se produce la eclosión del huevo y se completa el desarrollo de órganos como el digestivo, el aparato masticador o las aletas. La maduración sexual del pez cebra acontece 3-4 meses después de la fertilización, un corto periodo de generación a partir del cual la hembra puede llegar a generar unos 200 huevos por semana.

Los estudios genéticos encaminados al análisis del desarrollo animal, se han basado en la mutación de genes implicados en desarrollo embrionario, lo que ha permitido analizar numerosas enfermedades en seres humanos (genómica comparada) (Ingham, 2009), todo esto gracias a las demostradas relaciones sinténicas entre el genoma humano y el del pez (Barut y col., 2000).

El pez cebra tiene 25 cromosomas y su genoma está constituido por unos  $1.5 \times 10$  billones de pares de bases respecto a los  $3 \times 10$  billones de pares de bases que se presentan en mamíferos. Aunque se desconoce el número total de genes en el pez cebra, parece que el número total ha de ser muy similar al existente en el genoma de mamíferos.

La siguiente tabla resume los distintos estadios de desarrollo temprano del pez ([http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html)) que además quedan recogidos en la figura 12.

Estadio	Tiempo (horas desde la fertilización)	Características
1 célula	0-0,7	Huevo recién fertilizado. El blastodisco se segrega hacia el polo animal.
Segmentación o clivaje	1-2,5	Divisiones rápidas del blastodisco sin crecimiento celular.
Transición a blástula media	3	La velocidad de división disminuye. Los genes comienzan a transcribirse.
Epibolia	4-10	El blastodisco se aplana formando el blastodermo y se extiende cubriendo la yema.
Gastrulación	5-10	El blastodermo se desarrolla en capas: ectodermo, mesodermo y endodermo.
Segmentación	10-24	Aparece el estadio somita (división del cuerpo del animal). Se desarrolla la cola y comienzan a formarse los órganos primarios.
Faringulación	24-48	En este estadio están presentes todas las estructuras características de vertebrados. Son distinguibles los sistemas nervioso, muscular y cardíaco, y aparece una pigmentación temprana.
Eclosión	48-72	El desarrollo embrionario se ha completado.
Nutrición	96	La vejiga natatoria se llena y la larva comienza la búsqueda de alimento.



**Figura 12.** Etapas del desarrollo embrionario del *Danio rerio* post-fecundación: (A) estadio de una célula (B) dos células, (C) cuatro células, (D) ocho células, (E) blástula temprana, (F) blástula media, (G) blástula tardía, (H) 50% de epibolia, (I) gástrula, (J) 24 horas, (K) 48 horas y (L) 72 horas.

### 3.2.2 El papel B en el desarrollo del pez cebra

Los primeros trabajos que se han llevado a cabo para el estudio de la funcionalidad del B en animales, han ido encaminados al análisis de su implicación en el desarrollo embrionario. De entre ellos, destacan los realizados en el sapo africano *Xenopus laevis* (Fort y col, 1999) y en el pez cebra (Eckhert y col., 1999), gracias a los cuales se ha llegado a establecer la necesidad del B en el desarrollo del embrión y en su competencia reproductiva.

Mencionar que los estudios de la incidencia de la deficiencia de B en reproducción han demostrado su implicación en mamíferos roedores (Lanoue y col, 1998, 2000; Keehr y Hunt, 2000), especialmente en relación a funciones de membrana (Lanoue y col., 2000). También se han llevado a cabo en cerdos (Amstrong y col., 2001), pero en conjunto no han sido tan concluyentes como los desarrollados en *Xenopus laevis* o en *Danio rerio*, dada las dificultades, antes comentadas, de conseguir una deficiencia nutricional de B.

El estudio en *Xenopus laevis* realizado por Fort y col. (1999) permitió establecer que la privación de B en progenitores resultaba en un incremento severo en la aparición de huevos necróticos (54%). Aquellos que llegaban a desarrollarse mostraban una gastrulación anormal, sugiriendo una alteración en la estructura o/y función de la membrana, y menos del 20% sobrevivía a las 96h. En otro estudio realizado por Fort y col. (2002) se observó la implicación del B en el desarrollo de oocitos por un fallo en receptores de progesterona en membrana. Así, a nivel reproductivo, la deficiencia de B en hembras del anfibio, provocó alteraciones en ovarios y en la maduración de oocitos, y en machos, la disminución del peso en testículos y en la cantidad de esperma. Además de los efectos a nivel reproductivo, el aporte deficitario de B se tradujo en un fallo en la organogénesis de estómago, región craneofacial y cola.

En el pez cebra, se desarrollaron, como en *Xenopus*, ensayos para el análisis de la afección del B en la reproducción del pez. De acuerdo a lo obtenido por Rowe y Eckhert (1999), tras mantener a los peces adultos en un medio pobre en B durante 6 meses, se observó, que, tras la fecundación en dichas condiciones, aproximadamente un 92% de los embriones perecían respecto al 35% de los controles. Además, el estadio de segmentación apareció como el más sensible a la deficiencia, pues un 46% de los

embriones fecundados no completaban el estadio de blástula, y aquellos que lo lograron, presentaron malformaciones a nivel de membrana. Así mismo, se observó que el paso de los embriones fecundados a medio con B, 1 hora post-fecundación, reducía el número de embriones muertos. Un aspecto interesante que se recoge en dicho trabajo fue encontrar una afección en el desarrollo ocular, pues los adultos desarrollados en condiciones deficientes presentaron atrofia en los órganos fotorreceptores, por una reducción de ciertas regiones musculares caracterizadas por producir elevadas cantidades de membrana (Rowe y Eckhert, 1999), alteraciones que también fueron observadas en *Xenopus* (Fort y col., 1999).

Todo esto permite establecer que el zebrafish es un buen modelo para el estudio del papel del B en animales y que su implicación en alteraciones de membrana abre un nuevo camino para el estudio de la funcionalidad del B en seres vivos.

Recientemente además, se ha publicado la existencia de una elevada síntesis de glicanos y un intenso tráfico de membranas previo al desarrollo de órganos como aletas y mandíbula, 60-70 horas post-fertilización (Laughlin y col, 2008), por lo tanto, si esos glicanos son susceptibles de interaccionar con B, este momento de desarrollo podría ser especialmente dependiente del micronutriente, lo que facilitaría obtener niveles de deficiencia ante la posibilidad de esa alta implicación del B en dicho momento del desarrollo embrionario.



# ***OBJETIVOS***

---



## OBJETIVOS

Como se ha descrito en la introducción, cualquier papel fisiológico del B parece estar relacionado con su capacidad para formar enlaces con grupos *cis*-diol de moléculas con importancia biológica y, posiblemente, hacerlas funcionales gracias a esta reacción. Partiendo de esta base, el principal objetivo de este estudio, y de acuerdo con la trayectoria investigadora de nuestro grupo será detectar, identificar y analizar posibles ligandos de B que den sentido a su funcionalidad más allá de su papel como estabilizador de la pared celular al actuar como elemento de anclaje del dímero RGII. Teniendo en cuenta la problemática existente en el desarrollo de una metodología analítica efectiva para la detección de posibles ligandos de este micronutriente, se propone, como objetivo inicial del trabajo, desarrollar una técnica que permita captar potenciales ligandos de B a partir de los cuales poder analizar si su función biológica está relacionada con su posible interacción con B, e intentar determinar así las implicaciones del nutriente en el desarrollo y fisiología de los seres vivos en general. De manera particular, los dos modelos biológicos escogidos para nuestro estudio, tanto la simbiosis rizobio-leguminosa como el desarrollo embrionario del pez cebra, como representante del reino animal, poseen una alta dependencia de B y además, en ellos, parece factible la posibilidad de inducir su deficiencia y analizar los efectos de la misma en diferentes etapas de su desarrollo. Así, de forma particular, la consecución de los objetivos que se detallan a continuación, permitirá avanzar en el conocimiento del origen de las alteraciones producidas bajo deficiencia de B en las interacciones planta-microorganismo durante el proceso simbiótico rizobio-leguminosa y en la organogénesis y desarrollo del nódulo, así como extender el posible requerimiento de B a las diferentes etapas del desarrollo animal.

- 1) El papel biológico del boro, independientemente de su función, y condicionado por sus características químicas, va a estar ligado a su capacidad de ejercer de estabilizador de moléculas formando enlaces éster con grupos *cis*-diol. En base a este planteamiento, se diseñará una metodología utilizando la resina Amberlita

- IRA -743, que captura de forma específica ácido bórico e iones borato, para la captación de posibles ligandos de B en extractos de nódulos control y deficientes de B.
- 2) Se identificarán y analizarán los potenciales ligandos de B asociados a Amberlita, recurriendo para su reconocimiento a distintas técnicas analíticas como la espectrometría de masas MALDI TOF o la utilización de distintos anticuerpos. A partir de los ligandos identificados, se estudiará la posible vinculación de su función biológica con la presencia de B, con el fin de dar sentido al requerimiento del nutriente en el reconocimiento leguminosa-rizobio y en la organogénesis del nódulo.
  - 3) Se realizará un análisis comparativo del patrón proteico de las muestras de extractos de nódulos control y deficientes en B, con el fin de detectar e identificar componentes proteicos inducidos o reprimidos en condiciones deficientes del micronutriente. Se estudiará la evolución de estos durante el desarrollo de los nódulos, tratando de determinar su participación e importancia en el proceso simbiótico.
  - 4) Se analizará el efecto de la deficiencia de B en el desarrollo embrionario del pez cebra *Danio rerio*, actualmente aceptado como un modelo biológico muy útil en estudios de desarrollo animal, con el fin de poder determinar la implicación del micronutriente en las diferentes etapas del mismo. Para ello, se inducirá deficiencia en distintas ventanas de desarrollo y se tratará de establecer en qué momento se produce un mayor requerimiento de B en base a las alteraciones que se puedan observar tras la inducción de su deficiencia.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---



## MATERIALES

### ➤ Material biológico

#### Plantas

Los ensayos con plantas fueron realizados con *Pisum sativum* L. cv. Lincoln y *Phaseolus vulgaris* L. cv. Ambos cultivares están comercializados por “Semillas Fito S.A, Barcelona, España”. Ambos cultivares desarrollan plantas de porte bajo por lo que son adecuadas en tamaño a las dimensiones de la cámara de cultivo utilizada en nuestro laboratorio



**Figura 13.** A) *Phaseolus vulgaris* L. Cv; B) *Pisum sativum* L. cv. Lincoln

## Cepas bacterianas

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas

Cepa bacteriana	Principales características	Referencia bibliográfica
3841	<i>R.leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Sm <sup>R</sup> 300	Johnston y Beringer., 1975.
B625	3841 (pRP2JI) Sm <sup>R</sup> 300; Spc <sup>R</sup>	Wood y col., 1989.
B659	3841 lps::Tn5, no invade, Fix- Sm <sup>R</sup> 300.	Rae y col. 1991
B551	B556 EPS <sup>-</sup>	Borthakur y col. 1986

*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (300 *str*) (Johnston, y Beringer., 1975) fue utilizada como cepa silvestre por su capacidad de nodular guisante (*Pisum sativum*).

Las cepas de *R. leguminosarum* B659 y B551 fueron seleccionadas como cepas con alteraciones en los polisacáridos superficiales. La cepa B659 (3841 lps::Tn5), descrita por Rae y col., 1991, posee una drástica alteración del lipopolisacárido (LPS) al haber perdido el antígeno-O y poseer además alteraciones en la estructura del exopolisacárido (EPS), por ello, es incapaz de invadir de forma efectiva, y los nódulos que forma están vacíos. La cepa B551, derivada de la cepa B556, no productora de EPS al tener una mutación que provoca el bloqueo de su síntesis, no es capaz de generar nódulos en guisante, únicamente da lugar a unas pequeñas proliferaciones del tejido radicular

*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* B625 fue la cepa seleccionada por su capacidad de nodular judía (*Phaseolus vulgaris*). Es una cepa construida como derivado Spc<sup>R</sup> a partir de la cepa 3841 curada del plásmido simbiótico, 300 Str Spc ( $\Delta$  nod fix). A dicha cepa se le transfirió el plásmido pRP2JI, que confiere capacidad para nodular *Phaseolus* (Wood y col., 1989).

## Anticuerpos

Los anticuerpos y antiseros primarios utilizados en la inmunodetección se presentan en la tabla que aparece a continuación (Tabla 2).



**Tabla 2.** Anticuerpos y antisueros primarios utilizados en la inmunodetección

<b>Anticuerpos monoclonales*</b>	<b>Características</b>	<b>Isotipo y origen</b>	<b>Referencia</b>
AFRC MAC 265	Reconoce a la glucoproteína secretada a la luz del canal de infección y a los espacios intercelulares.	IgG <sub>2a</sub> Rata	VandenBosch y col., 1989
AFR MAC 203	Reconoce a un epítipo del antígeno O del LPS de <i>R. leguminosarum</i> 3841 que se expresa sólo a bajas concentraciones de O <sub>2</sub> y/o bajo pH	IgM Rata	Kannenberg y Brewin, 1989
AFRC MAC 57	Reconoce al antígeno O del LPS de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841.	IgM Rata	Brewin y col, 1986.
AFRC MAC 206	Reconoce un glicolípido de membrana de <i>Pisum sativum</i>	IgG <sub>2c</sub> Rata	Bolaños y col., 1996
JIM 5	Reconoce al ácido homogalacturónico con un nivel bajo de metil-esterificación.	IgG <sub>2a</sub> Rata	VandenBosch y col., 1989
<b>Antisueros**</b>	<b>Características</b>		<b>Referencia</b>
Anti-RGII	Reconoce al ramnogalacturonano II	Policlonal Conejo	Matoh T. y col., 1998
Anti-ABR 17	Reconoce a la proteína de repuesta a ácido abscísico, ABR17 ligada a procesos patogénicos.	Policlonal Conejo	Barratt y col., 1989
Anti-leghemoglobina	Reconoce a la leghemoglobina de guisante ( <i>Pisum sativum</i> )	Policlonal Conejo	Bisseling y col., 1979
Anti-APX	Reconoce a la ascorbato peroxidasa citosólica de guisante ( <i>Pisum sativum</i> )	Policlonal Conejo	Dalton y col., 1993

\*El anticuerpo secundario utilizado frente a los monoclonales obtenidos en rata fue  $\alpha$ IgG–rata conjugado con peroxidasa de rábano cuya reacción es detectable por quimioluminiscencia.

\*\*El anticuerpo secundario utilizado frente a los antisueros obtenidos en conejo fue  $\alpha$ IgG–conejo conjugado con peroxidasa de rábano cuya reacción es detectable por quimioluminiscencia.

Como anticuerpo secundario en inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas, se utilizaron, respectivamente, anti-rata IgG conjugado con oro coloidal de 10 nm producido en cabra y anti-conejo IgG conjugado con oro coloidal de 10 nm producido en cabra.

## Oligonucleótidos

- *ABR17*

Basándonos en la homología de las secuencias existentes en las bases de datos para *M. sativa* y *M. truncatula*, y partiendo del ADN complementario de *P. sativum*, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para *P. sativum* con el fin de utilizarlos como cebadores en la reacción de Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR):

*ABR17* Fw: 5' CGT TTC AAC TGT TGC ACC AC 3' T<sub>m</sub>= 58°C

*ABR17* Rv: 5' CGA TGG ATC CAC CGT CAG AA 3' T<sub>m</sub>= 58°C

Para realizar la RT-PCR con estos cebadores, se empleó una temperatura de anillamiento de 58°C y una temperatura de elongación de 72°C. El tamaño del fragmento esperado fue de 340 pb.

- *Leghemoglobina5-10*

Al igual que para *ABR17*, para amplificar *Leghemoglobina5-10* se diseñaron cebadores para su utilización en la reacción de Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR):

*Leghemoglobina 5-10* Fw: 5' GGG TTT TAC TGA TAA ACA AG 3'

T<sub>m</sub>= 58°C

*Leghemoglobina 5-10* Rv: 5' CAT TGC CTT CTT AAT TGC G 3'

T<sub>m</sub>= 58°C

Para realizar la RT-PCR con estos cebadores, se empleó una temperatura de anillamiento de 58°C y una temperatura de elongación de 72°C. El tamaño del fragmento esperado fue de 444 pb.

- *msc27*

Los cebadores de este gen, que se utilizó como marcador de expresión constitutiva, son los siguientes:

*msc27* FW: 5' GGAGGTTGAGGGAAAGTGG 3' T<sub>m</sub>= 58°C

*msc27* RV: 5' CACCAACAAAGAATTGAAGG 3' T<sub>m</sub>= 58°C

El tamaño del fragmento resultante es de 350 pb.

### **Pez cebra**

El pez pebra (*Danio rerio*) (Fig.14) es un pequeño pez tropical de agua dulce. Los ensayos con pez zebra fueron realizados a partir embriones de comercializados por ZF Biolabs (Tres Cantos, España).



**Figura 14.** Pez Cebra (*Danio rerio*) adulto.

### **➤ Medios de cultivo**

#### **Medios de cultivos para plantas**

Para el desarrollo de las plantas de guisante y judía en tiestos, la solución nutritiva aportada fue el medio FP para leguminosas noduladas (Fahraeus, 1957) (Tabla 3), que posee los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de la planta y para el desarrollo de la simbiosis.

**Tabla 3.** Composición del medio FP.

Solución	Componentes	Solución madre (g/L)	Volumen (ml) en 1 L de medio*
1	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	40	2,5
2	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40	3
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30	3.33
4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	45	3.33
5	Citrato Férrico	2,5	2
6**	Nitrato de potasio	161,48	5
	<b>Elementos traza de Gibson</b>		
6	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.03	1
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22	
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.08	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.08	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,57***	

\* Ajustar el pH final a 6,3–6,7

\*\*Se añadió nitrógeno al medio cuando las plantas no fueron inoculadas.

\*\*\*El ácido bórico fue añadido en plantas control, y su adición fue suprimida para obtener plantas deficientes en B,

### Medios para bacterias

Para el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas, se utilizaron tanto medios de cultivo líquidos como sólidos, esterilizados en autoclave a ciclo largo (120°C, 20 minutos).

Para el cultivo de las cepas rizobiáceas se utilizó el medio rico TY (Beringer, 1974) (tabla 4). Se empleó el antibiótico estreptomycin (Sm) a una concentración (mg/ml) de 300 y espectinomycin (Spc) a una concentración (mg/ml) 100.

**Tabla 4.** Composición del medio TY.

Componentes	Cantidad (g/L)
Tryptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0.5
Agar*	15

\* Cuando se requiera preparar medio sólido

**Medios sin B**

Para tratamientos deficientes en B, el micronutriente no fue añadido al medio y las trazas existentes fueron eliminadas mediante el uso de la resina quelante de B, Amberlita IRA-743 de Sigma Co (Asad y col., 1997) cuya capacidad de adsorción de B es de 0,46 meq/g. Además, no se utilizaron recipientes de vidrio, por estar compuestos de borosilicato, sino de policarbonato y de polipropileno, previamente lavados con una solución de ácido clorhídrico al 6% para solubilizar y retirar las trazas de B que pudieran contener. No obstante, mediciones previas determinaron el contenido de B en las soluciones y medios de cultivo, mediante Azometina H (Wolf, 1974; Martínez y col., 1986), sin detectar la presencia del micronutriente (límite de detección de la técnica en  $0.02 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

**Medio para Pez Cebra**

El medio empleado para el crecimiento de embriones fue el medio Hank (Tabla 5)

**Tabla 5.** Medio Hank para el crecimiento de embriones de Zebra Fish y soluciones madre para el mismo (<http://zfin.org/>).

<b>Medio Hank</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Hank's Stock 1	1.0 ml
Hank's Stock 2	0.1 ml
Hank's Stock 4	1.0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	95.9 ml
Hank's Stock 5	1.0 ml
Hank's Stock 6	1.0 ml (en fresco)
Ajustar con NaOH pH 7,2	

<b>Hank's Stock 1</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
Llevar a un volumen final de 100 ml con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

<b>Hank's Stock 2</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.358 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.60 g
Llevar a un volumen final de 100 ml con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

Hank's Stock 4	
Componentes	Cantidad
CaCl <sub>2</sub>	0.72 g
Llevar a un volumen final de 50 ml con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

Hank's Stock 5	
Componentes	Cantidad
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.23 g
Llevar a un volumen final de 50 ml con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

Hank's Stock 6	
Componentes	Cantidad
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
Llevar a un volumen final de 10 ml con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

### ➤ Reactivos y antibióticos

Los principales reactivos utilizados fueron de grado analítico y procedían de Merk (Darmstadt, Alemania), Sigma, (St. Louis, MO, USA), Duchefa Biochemie (The Netherlands), Pronadisa (Laboratorios Conda, Madrid, España) y Panreac (Barcelona, España).

Los reactivos para electroforesis, se obtuvieron de Sigma, Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Duchefa Biochemie (Holanda) y Panreac (Barcelona, España).

Los antibióticos utilizados procedían de TRANSGENOMIC (Cheshire, Reino Unido), Laboratorio Reig Jofré (Barcelona, España), DUCHEFA BIOCHEMIE (Holanda) y Sigma (St. Louis, MO, USA).

## MÉTODOS

### Esterilización de las semillas

La esterilización de las semillas constituye el paso previo a la germinación de las mismas. Su finalidad es poder realizar los trabajos posteriores libres de contaminación por la existencia de microorganismos en la superficie externa de la semilla. El protocolo seguido es válido tanto para guisante (*Pisum sativum*) como para judía (*Phaseolus vulgaris*), y se presenta a continuación:

En un tubo tipo “Falcon” se añadieron las semillas. Posteriormente se añadió etanol al 100% y se agitó suavemente durante 1 minuto. Se retiró el etanol y se añadió al tubo lejía al 30%, y se agitó durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió al lavado de las semillas con agua destilada estéril. Se realizaron tantos lavados como fue necesario para disipar completamente el olor a lejía del tubo. Por último, las semillas se colocaron en una placa Petri que se dejó en oscuridad, a 16°C “*Over Night*” (O/N) hasta el día siguiente (proceso de estratificación fría necesario para que las semillas germinen de forma temporalmente homogénea). El período de estratificación fría se puede alargar hasta una semana, pero los mejores resultados se han obtenido con un período de estratificación de 24 a 48 horas.

### Germinación de las semillas

La germinación de las semillas tuvo lugar en bandejas con perlita, sustrato sólido químicamente inerte que no libera B en cantidades detectables, incluso tras un proceso de autoclavado.



**Figura 15.** Soportes físicos de desarrollo de la planta, de germinación de las semillas (A) y tiestos Riviera (B).

Para la germinación en bandejas (Fig.15 A), fue necesaria la esterilización previa de las mismas. Para ello, una vez lavadas con agua, jabón y lejía, y aclaradas con agua destilada, se iluminaron con luz ultravioleta durante unos 10 minutos para completar su esterilización. Posteriormente, se añadió una capa de perlita de aproximadamente 3 cm. La perlita se esterilizó primeramente en autoclave a ciclo largo (120°C y 20 minutos). A continuación, se empapó la perlita con medio FP sin B, hasta que el sustrato sólido quedó bien humedecido. Sobre la perlita bien húmeda, se colocaron las semillas esterilizadas y estratificadas.

Las semillas germinaron en oscuridad a una temperatura de entre 25-28 °C. Tras 96 horas, las plántulas pudieron ser transferidas a tiestos.

### **Desarrollo de las plantas**

Para la obtención del material biológico deficiente en boro y control, se procedió al desarrollo de las plantas en tiestos tipo Riviera (Fig.15 B), con un depósito inferior comunicado por capilaridad con la parte superior, donde se añadió la solución nutritiva.

Primero, se montó del soporte físico (tiesto) con la perlita incluida hasta cubrir el volumen superior del mismo. Todo ello se esterilizó en autoclave, cubriendo la superficie con perlita, a ciclo largo (20 minutos a 120°C).



Una vez esterilizado el soporte físico, se replantaron en él las semillas antes germinadas. Utilizando tiestos de 20 x 20 cm, se plantaron, aproximadamente, 9 plántulas por tiesto, sobre la perlita previamente humedecida.

La solución nutritiva FP con B o sin B se renovó a través del depósito inferior de los tiestos de forma periódica, aproximadamente cada tres días.

### **Cultivo de las bacterias**

Las cepas de rizobios se crecieron en medio TY con los antibióticos correspondientes.

Los cultivos líquidos se crecieron en un agitador orbital (150 r.p.m.) a una temperatura de 28°C. Para lograr una mayor eficiencia de nodulación, las bacterias se utilizaron en fase exponencial de crecimiento.

### **Inoculación**

Con el fin de agotar en lo máximo posible las reservas de B procedentes de la semilla, y asegurar que toda la interacción simbiótica ocurría en condiciones de déficit de B, las plántulas se desarrollaron sin inocular durante 12 días tras su trasplante a los tiestos (Tesis doctoral Luis Bolaños Rosa, 1993).

Para la inoculación de las plántulas, se crecieron las cepas bacterianas hasta alcanzar una fase exponencial avanzada de crecimiento en medio TY líquido y en agitación

Partiendo del cultivo en fase de crecimiento exponencial, se calculó la Densidad Óptica (D.O) de éste llevando el inóculo a una D.O<sub>620nm</sub> de 0,03, lo que corresponde a una concentración celular de aproximadamente  $10^8$  células ml<sup>-1</sup>. Posteriormente, se inoculó la base del tallo de cada planta con 1 ml de la suspensión bacteriana.

### **Crecimiento de las plantas**

El desarrollo de las plantas tuvo lugar bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad en cámara de cultivo. Se estableció un ciclo lumínico de 16 h de luz y 8 h de

oscuridad, de 25°C de temperatura diurna y 18°C de temperatura nocturna, y con humedad relativa mantenida entre el 60-70%.

### **Recogida de material biológico de origen vegetal**

Dependiendo del tipo de estudio a realizar, las plantas fueron procesadas de diferentes maneras. Se emplearon técnicas de extracción de proteínas o ácido ribonucleico de nódulos, raíces y tallos, y, por otro lado, se llevó a cabo el fraccionamiento de nódulos para aislar los distintos componentes del mismo (fracción soluble, bacteroides, membrana peribacteroidea y fluido peribacteroideo).

Para la caracterización fenotípica se utilizó la lupa Leica MZ7<sub>5</sub>, capturándose las imágenes con la cámara NIKON Coolpix 995.

### **Obtención de los extractos de nódulos**

Para la obtención de extractos de nódulos, éstos se recogieron de plantas control y crecidas bajo deficiencia de boro, y se homogeneizaron a 4°C en una solución de sacarosa 0.5 M preparada en tampón Tris/DTT (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM ditioneitol), usando como inhibidor de proteasas la p-aminobenzamidina 0.1 mg/ml o el cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P2714) y PVPP (polivinilpirolidona) como abrasivo (Brewin y col., 1985).

#### *Fraccionamiento de nódulos*

El fraccionamiento se realizó en nódulos de los sistemas simbiótico *P. sativum*-*R. leguminosarum* partiendo de extractos obtenidos según lo descrito en el apartado anterior.

El homogenizado obtenido se filtró a través de membranas Miracloth con el objetivo de eliminar restos celulares, y posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto, dando como resultado dos fases bien diferenciadas: sobrenadante y sedimento. El sobrenadante, que contenía la mayor parte de la fracción soluble, se centrifugó a 100000

g durante 30 minutos en una ultracentrífuga refrigerada (4°C). De éste, el sobrenadante resultante se almacenó a -80°C en previsión de una posible utilización.

El sedimento procedente del homogenizado de nódulos, cuyo contenido correspondía fundamentalmente a bacterias, bacteroides y simbiosomas intactos (fracción simbiosomal), se fraccionó mediante choque osmótico en un gradiente de sacarosa (Bradley y col., 1986) siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) Se resuspendió la fracción simbiosomal en sacarosa 0.5 M en Tris/DTT y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto sobre un colchón de sacarosa 1.2 M en Tris/DTT para eliminar la PVPP.
- 2) Se separó la fracción simbiosomal y se desechó el colchón de sacarosa 1.2 M con PVPP.
- 3) Se lavó la fracción simbiosomal dos veces en sacarosa 0.5 M, centrifugándose a 10000 g 1 minuto
- 4) Se sometió a un choque osmótico la fracción simbiosomal para romper los simbiosomas centrifugando a 10000 g 5 minutos en sacarosa 0.5 M sobre un colchón de sacarosa 1 M en Tris/DTT.
- 5) Se desechó la sacarosa 0.5 M y se guardó el sobrenadante 1 correspondiente a sacarosa 1M, fluido peribacteroideo y membrana peribacteroidea (mpb).
- 6) Se separó la mpb de los bacteroides en la fracción simbiosomal mediante dos lavados en Tris/DTT, guardando los correspondientes sobrenadantes, 2 y 3 (Tris/DTT, fluido peribacteroideo y membrana peribacteroidea).
- 7) Se homogeneizaron y ultracentrifugaron los sobrenadantes 1, 2 y 3 a 10000 g durante 30 minutos para separar las fracciones correspondientes a la membrana peribacteroidea (sedimento) y fluido peribacteroideo (sobrenadante).
- 8) Se purificaron los bacteroides en un gradiente de sacarosa (17.5%, 25%, 35%, 52% y 70%) mediante centrifugación durante 10 minutos a 2500 rpm en una centrífuga de rotor basculante Heraeus.
- 9) Se resuspendieron las fracciones correspondientes a membrana peribacteroidea y bacteroides en Tris/DTT 50 mM pH= 7.4 y se guardaron todas las fracciones a -20°C hasta su utilización.

Para la purificación de membranas celulares en raíces no infectadas, se centrifugó el homogeneizado filtrado a través de membrana Miracloth y se procedió a fraccionar las muestras de acuerdo con el protocolo descrito (punto 6), con el fin de separar la fracción de membrana de los orgánulos (mitocondrias y plastidios).

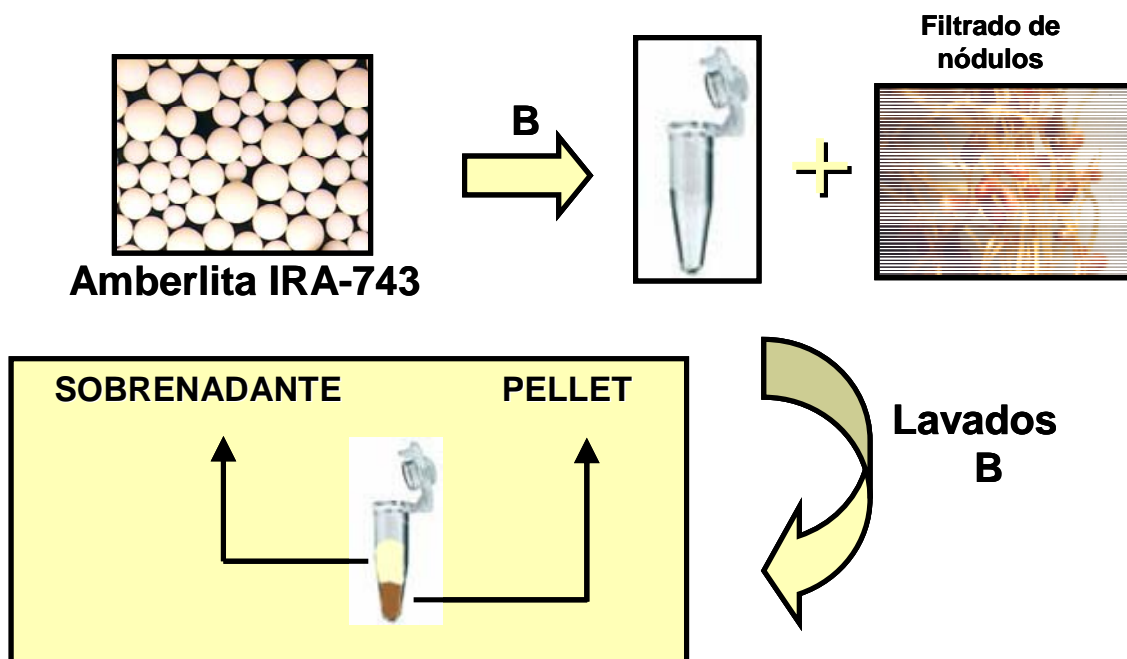
### **Cuantificación de proteínas**

La cuantificación proteica, se realizó de acuerdo al método establecido por Bradford (Bio-Rad Protein Assay) (Bradford, 1976). Se aplicó el método Micro-Bradford, para lo cual fue necesario preparar previamente la curva patrón utilizando BSA en un rango de entre 1 y 25 µg de proteína. Para la determinación de la concentración proteica en las muestras, éstas se diluyeron 1:100, 1:500 y 1:1000, por duplicado, y se llevaron a un volumen final de 800 µl. Se añadió posteriormente un volumen de reactivo Bradford (BIO-RAD Protein Assay, Cat. 500-0006) de 200 µl, se mezcló mediante inversión y se incubaron las muestras durante 12 minutos en oscuridad. Tras el tiempo de incubación, se midieron las muestras a 595 nm utilizando un biofotómetro (eppendorf), empleando como blanco agua o el tampón utilizado para la extracción, según compatibilidad con el reactivo.

### **Metodología para la captación de posibles ligandos de Boro por retención con Amberlita IRA-743**

Para la captación y posterior detección de posibles ligandos de boro, se puso a punto una técnica basada en el uso de la resina quelante de B, Amberlita IRA-743 con una capacidad de adsorción de B de 0,46 meq/g (Asad y col., 1997) (Fig.16), que, como se ha mencionado anteriormente, fue empleada para la eliminación de trazas de B en el crecimiento de plantas deficientes en B. Una vez igualadas las cargas proteicas, se incubó 1 ml de extractos procedentes del homogeneizado o del fraccionamiento de nódulos, con una carga de proteínas de aproximadamente 1,4 µg/µl, en tubos de microcentrífuga tipo eppendorf de 1,5 ml, junto con 0,5 g de Amberlita equivalente a un volumen de, aproximadamente, 200 µl. Se incubó en agitación (agitador orbital a 150 r.p.m.) durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm, recogiendo el sobrenadante y el sedimento (amberlita). Éste último se sometió a una

serie de lavados con tampón Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM. Finalmente, se solubilizó el material asociado a la resina con tampón de solubilización Laemmli (Laemmli, 1970).



**Figura 16.** Metodología para la captación de posibles ligandos de boro.

Así mismo, se utilizó como control negativo la resina Dowex<sup>R</sup> 1-X8 (Bio-Rad Laboratories) de intercambio aniónico, con una capacidad de intercambio total de 3,2 meq/g.

### Inmunoprecipitación

La precipitación de proteínas reconocidas por un anticuerpo primario específico se realizó mediante la técnica de inmunoprecipitación (IMP), para lo cual se prepararon muestras con una concentración proteica de 0,4 µg/µl en tampón de IMP (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, cocktail de proteasas, EDTA 1mM y DMSO (dimetil sulfóxido)), a las que se añadió el anticuerpo primario (5µl) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente tuvo lugar la incubación con anticuerpo secundario (que reconoce al anticuerpo primario) (10 µl) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación, y tras ella, se añadieron 40 µl de proteína A-sefarosa al 10%,

incubándose la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se efectuaron 2 lavados con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150mM, IGEPAL 0,5% u SDS 0,1%) y un lavado con Tris-Acetato 10 mM pH 7,5.

Como control para descartar posibles uniones inespecíficas se incubaron previamente las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación, con la proteína A-sefarosa, que se eliminó posteriormente mediante centrifugación, recogiendo el sobrenadante, al que se sometió al protocolo descrito.

### **Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

Para la obtención del patrón peptídico de los extractos de nódulos se recurrió a la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida.

#### *Preparación de las muestras para electroforesis*

Las proteínas a separar se extrajeron en un tampón de rotura y solubilización (tampón Laemmli, Laemmli, 1970) cuya composición queda recogida en la tabla 6.

**Tabla 6.** Composición tampón de rotura y solubilización

Agua destilada	1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1 ml
Glicerol	2 ml
SDS al 10%	3,2 ml
2-β-Mercaptoetanol	0,8 ml
Azul de Bromofenol al 5% (p/v)	0.02 ml

Se añadió a las muestras tampón Laemmli 2x en la relación 1:1, y se llevaron a ebullición durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron durante 1 minuto a 13000 r.p.m, recogándose el sobrenadante.

*Electroforesis en geles de poliacrilamida–SDS*

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La concentración de poliacrilamida en el gel de separación fue del 12% (Tabla 7) (p/v) mientras que en el gel de concentración fue del 4% (p/v) (Tabla 8). Tras determinar la concentración de proteínas en las muestras por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bradford, 1976), los geles se cargaron con una concentración proteica de aproximadamente 0,5-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en un sistema Miniprotean II (BioRad) añadiendo el tampón de electroforesis (Tabla 9).

**Tabla 7.** Composición del gel de separación de proteínas con una concentración de poliacrilamida del 12%

Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	5 ml
Acrilamida/ <i>bis</i> -acrilamida 30/1	8 ml
SDS 10%	200 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O mili RO	6,1 ml
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	10 $\mu\text{l}$
Amonio persulfato (APS) 10% (p/v)	100 $\mu\text{l}$

**Tabla 8.** Composición del gel de concentración con un contenido en poliacrilamida del 4%

Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
Acrilamida/ <i>bis</i> -acrilamida 30/1	1,3 ml
SDS 10%	100 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O mili RO	3 ml
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	10 $\mu\text{l}$
Amonio persulfato (APS) 10% (p/v)	50 $\mu\text{l}$

**Tabla 9.** Composición del tampón de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Running Buffer 5x)

Tris 25 mM	15 g
Glicina 190 mM	72 g
SDS	5 g
Ajustar pH a 8.3 con HCl, y enrasar a 1 L	

### Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

Cuando se requirieron ensayos enzimáticos *in gel*, las condiciones de estudio fueron no desnaturalizantes, para lo cual se modificó la composición del tampón de solubilización de proteínas (Tabla 10) descartando la utilización del SDS.

**Tabla 10.** Composición del tampón de solubilización de proteínas en condiciones no desnaturalizantes

Agua destilada	2,5 ml
Tris-HCl 0.3 M pH 8.8	1 ml
Glicerol 80%	4 ml
Azul de Bromofenol al 5% (p/v)	0.02 ml

Para resolver las muestras proteicas se descartó la utilización de SDS, tanto en el gel de poliacrilamida (Tabla 11) como en el tampón de electroforesis (Running Buffer) (Tabla 9).

**Tabla 11.** Composición del gel de separación con una concentración de poliacrilamida al 10% para la resolución de muestras proteicas en condiciones no desnaturalizantes

Tampón Tris-HCl 0,3 M pH 8,8	6 ml
Acrilamida/ <i>bis</i> -acrilamida 30/1	6,6 ml
H <sub>2</sub> O mili RO	7,2 ml
TEMED	10 µl
Amonio persulfato (APS) 10% (p/v)	100 µl



## Tinción de geles de proteínas

### *Tinción con Coomassie*

Principalmente se utilizó esta tinción como control de carga de las muestras proteicas así como por su compatibilidad con el análisis por espectrometría de masas MALDI TOF, al no interferir en el mismo.

La tinción con Coomassie supone una rápida y sencilla metodología en la que se incubaba el gel de proteínas durante 15 minutos en la solución de Coomassie (EZBlue™ Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0,1%, metanol al 40% y ácido acético al 10%, filtrado). Tras la incubación, se procedió a la destinción empleando la solución compuesta por metanol al 40% y ácido acético al 10%.

### *Tinción con plata*

Se recurrió a la tinción de plata cuando fue necesaria una mayor sensibilidad en la tinción de proteínas (aprox. 1 ng). Primeramente se incubó el gel en la solución de fijación (ácido acético glacial al 10%(v/v), etanol 30% (v/v)) “*Over Night*”. Tras la incubación con la solución de fijación, se lavó el gel con la solución de lavado (etanol al 20% (v/v)) durante 20 minutos, realizando un posterior aclarado en agua destilada durante 10 minutos. A continuación se incubó el gel en la solución sensibilizadora (tiosulfato de sodio al 0,02% (p/v)) durante 1 minuto exacto, tras el cual se efectuaron 3 lavados de 20 segundos en agua y se dejó incubar en la solución de nitrato de plata (nitrato de plata al 0,2% (p/v)) durante 45 minutos. Después de los 45 minutos, se lavó el gel en agua destilada durante 10 segundos y se procedió al revelado utilizando la solución de revelado (Carbonato de sodio (0,3% (p/v), formaldehído (0,025% (v/v) y 10 mg/ml de tiosulfato de sodio) hasta que aparecieron las bandas. Para parar la reacción se empleó la solución de parada (ácido acético glacial al 2,5% (v/v) y 50 mg/l de tris básico).

### **Electrotransferencia y detección inmunológica**

Las muestras ya separadas se transfirieron electroforéticamente (“western blot”) a un soporte sólido, consistente en una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu$ m de diámetro de poro, en un aparato de transferencia vertical (Mini Trans-Blot, BioRad), usando como tampón de transferencia Tris 25mM (pH 8.3), glicina 192 mM y metanol 20% (v/v). La transferencia se realizó a 100 V durante 1 h a 4°C o a 30 V durante 12 h a temperatura ambiente. El tampón de transferencia se mantuvo en agitación mecánica para asegurar una temperatura homogénea en todo el tanque de transferencia. Una vez transferidas las muestras e inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa, se procedió a la detección inmunológica siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) Se lavó la membrana de nitrocelulosa en tampón TBS (Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, NaCl 200 mM) durante 10 minutos.
- 2) Se bloqueó la membrana en BSA (seroalbúmina bovina) al 5% (p/v) en TBS durante 30 minutos.
- 3) Se lavó dos veces durante 5 minutos en TBS.
- 4) Se incubó con el anticuerpo primario con la dilución adecuada (1:100 para monoclonales o 1:1000 para antisueros) en BSA al 1% (p/v) en TBS “*Over Night*”, en refrigeración (4°C) y en agitación.
- 5) Se lavó dos veces durante 5 minutos en TBS.
- 6) Se incubó con el anticuerpo secundario (1:1000 para monoclonales o 1:10000 para antisueros) diluido en BSA al 5% (p/v) en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 7) Se lavó 2 veces durante cinco minutos en TBS y 1 vez en agua destilada durante 10 minutos.

### **Reutilización de la membrana de nitrocelulosa (stripping)**

Cuando la inmunodetección con más de un anticuerpo se realizó sobre la misma membrana, se recurrió previamente a la eliminación del primer anticuerpo utilizado mediante el protocolo de borrado o “*stripping*”, incubando la membrana con  $\beta$ -

mercaptoetanol 100mM, SDS 10% y Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8 en un volumen final de 25 ml durante 30 minutos a 50 °C.

### **Revelado de las inmunodetecciones**

El revelado de la inmunodetección se llevó a cabo utilizando el protocolo de ECL™ Western Blotting Systems GE Healthcare (Amersham, Life Science). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa llevan asociada la capacidad de ser detectados por quimioluminiscencia. Para esta detección, se empleó el reactivo ECL, que se preparó a una dilución 1:1. Una vez mezclado, se añadió sobre la membrana y se dejó en agitación durante 1 minuto. Tras incubar la membrana con el reactivo, se secó y se llevó acabo el proceso de exposición y revelado, para lo que se utilizaron películas fotográficas y reactivos de KODAK y Amersham. El tiempo de exposición de la membrana sobre la película varió dependiendo de los anticuerpos utilizados así como del tipo de muestra a tratar, con un máximo de señal a los 20 minutos tras la exposición con el reactivo.

### **Electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida (IPGphor, Ettan Dalt6)**

Para la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2-D PAGE) (O'Farrell, 1975), se llevaron acabo los distintos puntos que se describen a continuación:

#### *Precipitación de proteínas*

Previa electroforesis bidimensional, las muestras proteicas de concentraron mediante la metodología que se describe a continuación:

Se añadió ácido desoxicólico (DOC) al 15% para una dilución final 1:10 con la muestra proteica, y posteriormente se procedió a su agitación. Tras 10 minutos a temperatura ambiente se añadió tricloroacético (TCA) al 72% para una dilución 1:10 final con la muestra proteica. Se incubaron las muestras durante 2 horas en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron 300 µl de acetona al 80% (previamente pre-enfriada a -20°C) y se dejaron las muestras en hielo durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante

20 minutos a 4°C. Tras descartar de nuevo el sobrenadante, se dejó secar el sedimento, y se guardaron las muestras a -20°C.

#### *Rehidratación de la muestra proteica y de la tira o “strip”*

En primer lugar, se rehidrató la tira o “strip” (Immobiline Drystrip pH 3-10, 7cm) donde tuvo lugar la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Para ello, al tampón de rehidratación (Tabla 12) se le añadió el DTT en fresco y el IPG Buffer (específico para cada gradiente de pH) (Amersham, Life Science). En nuestro caso, las tiras utilizadas fueron del rango de pH 3 a 10 (no lineal) de un tamaño de 7 cm. Para rehidratar la tira se añadieron 125 µl del tampón de rehidratación con IPG Buffer en el carril del soporte, donde se colocó la cara de la tira con el gel en contacto con el tampón de rehidratación. Una vez colocada la tira sobre el carril, se añadió aceite (PlusOne, DryStrip Cover Fluid, Amersham, Life Science) para evitar el contacto del gel con el aire, lo que impide su correcta rehidratación. El tiempo ideal de rehidratación fue de 13 horas con un máximo de 16, a temperatura ambiente. Así mismo, las muestras proteicas precipitadas se rehidrataron con un volumen de 125 µl del tampón de rehidratación para lograr una concentración proteica final de 1 µg/ µl, incubándose a 4°C O/N.

#### *Primera dimensión*

Para la primera dimensión, se utilizó el aparato Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) en el que se colocó la placa de cerámica o manifold equilibrado. Se recogió la tira del soporte de rehidratación y se eliminó el exceso de aceite. A continuación, se colocó la tira con el gel orientado hacia arriba en posición concordante con de acuerdo a la posición del ánodo y del cátodo, y se montó la estructura necesaria para cargar la muestra proteica. De nuevo, se cubrió el manifold con aceite y se colocaron los electrodos. Finalmente, y una vez cargada la muestra, se seleccionó el programa o protocolo para correr la muestra en el software del aparato.

En nuestro caso, el protocolo seguido constó de 4 pasos:

S1- 300 V - 0:30 h

S2 - 1000 V - 1 h

S3 - 8000 V - 2 h

S4 - 8000 V - 4 h

La intensidad durante todo el proceso fue constante con un valor aproximado de 50  $\mu$ A.

**Tabla 12.** Composición de la del tampón de rehidratación

Urea	12 g
3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS)	0,5 g
Azul de bromofenol 5%	5 $\mu$ l
Ditiotreitol (DTT)	0,007 g (por cada 2,5 ml de tampón de rehidratación)
IPG Buffer	0.5% IPG Buffer (12,5 $\mu$ l por cada 2,5 ml de tampón de rehidratación para tiras de 7 cm)
Llevar con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> a un volumen final de 25 ml	

### *Segunda dimensión*

Para la segunda dimensión fue necesario el equilibrado de las tiras utilizando 5 ml del tampón de equilibrado (Tabla 13) para cada una de ellas. Se incubaron posteriormente en agitación durante 15 minutos. A continuación se añadió la yodo acetamida (IAA) a otros 5 ml de tampón de equilibrado con el objetivo de alquilar al DTT y a las proteínas. Se dejó en agitación durante 15 minutos.

Simultáneamente al equilibrado de las tiras, se preparó el gel de separación de poliacrilamida. Una vez solidificado se colocó en él la tira equilibrada de tal forma que quedara en contacto con el gel. Los marcadores de peso molecular de proteínas (BIO-

RAD Prestained SDS-PAGE Standars Broad Range) se cargaron a un lado de la tira sin entrar en contacto con la misma, impregnando 5 µl de los mismos en un trozo de papel Whatman 3MM. Finalmente se añadió agarosa 0,5% con azul de bromofenol 0,001% precalentada a 95°C con el fin de cubrir la tira.

Las muestras se resolvieron en el gel de poliacrilamida a intensidad constante (15 mA por gel) y se aumentó la misma cuando la muestra entró en el gel de separación llevándola a una intensidad constante final de 30 mA por gel.

**Tabla 13.** Composición de la solución de equilibrado

Urea	72,1 g
Glicerol 87%	ml
Tris-HCl 75 mM pH 8,8	10 ml
SDS 10%	40 ml
Azul de bromofenol 5%	10 µl
(Ditiotreitol) DTT	0,1 g por cada 5 ml de tampón de equilibrado (añadir en fresco)
Yodo acetamida (IAA)	125 mg por cada 5 ml de tampón de equilibrado (añadir en fresco).
Llevar con H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> a un volumen final de 200 ml	

### **Espectrometría de masas MALDI TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*)**

El análisis de las muestras proteicas por espectrometría de masas MALDI TOF fue realizado por la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid (<http://www.fpcm.es/protIHP.htm>).

Es una técnica analítica que fue utilizada para el análisis de las muestras proteicas resultantes de la electroforesis unidimensional y bidimensional en geles de poliacrilamida. Consiste en la ionización de las muestras proteicas que se encuentran embebidas en una matriz sólida orgánica. Tras la digestión con tripsina, se irradia la

muestra con un láser pulsado (láser de nitrógeno) que ioniza la muestra digerida y en el analizador de tiempo de vuelo (TOF), los iones se separan en función de su masa y carga tras su aceleración en el vacío por un campo eléctrico. El tiempo que tardan en recorrer el analizador viene determinado por esos dos parámetros. El resultado de la espectrometría es un mapa o huella peptídica.

La base de datos utilizada para la identificación proteica fue Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Para la interpretación de los datos ofrecidos por ésta, se realizaron varias comprobaciones hasta determinar la proteína problema. En primer lugar, se comprobó que aquellas proteínas con mayor *score* (puntuación dada de acuerdo con el algoritmo establecido por Mascot (Perkins y col., 1999)) correspondían a proteínas de la especie (organismo) analizada. Además, se comprobó que la masa teórica (ofrecida por Mascot) coincidía con la masa experimental.

Otros factores que se tuvieron en cuenta en la identificación proteica fueron: el número de péptidos identificados por cada proteína (un mayor número daba más fiabilidad respecto a aquellas en las que sólo se identificaba un péptido con alta masa molecular, teniendo en cuenta su cobertura de secuencia), la existencia de contaminaciones o alteraciones proteicas como degradaciones parciales.

### **Tratamiento con proteinasa K**

Cuando fue necesaria la identificación de la naturaleza de algunos antígenos o de algunas interacciones macromoleculares, las muestras se desproteinizaron con proteinasa K.

Se llevaron las muestras a una concentración proteica final de 0,5 µg/µl para un volumen de 200 µl de muestra. Se añadió Proteinasa K a una concentración de 50 µg/µl, y se incubó la mezcla a 37°C durante 90 minutos. Posteriormente se hirvió la muestra durante 10 minutos, y tras enfriarla, se añadió de nuevo proteinasa K a una concentración de 100 µg/µl, incubándose la misma a 37°C durante 1 h. Finalmente, y tras la centrifugación a 13000 rpm durante 1 minuto, se cargaron 200 µl de tampón de solubilización de proteínas Laemmli 2x en 200 µl de sobrenadante de cada muestra y se hirvieron durante 10 minutos a 95°C.

### **Oxidación con periodato**

Del mismo modo, para comprobar la presencia de componentes carbohidratados en epítomos objeto de estudio, se aplicó la oxidación con periodato. El estudio de la sensibilidad a la oxidación con periodato se basó en el protocolo establecido por Woodward, Young y Bloodgood (1985). Sobre la membrana de nitrocelulosa se añadieron gotas de aproximadamente 2 µl de muestra (con una concentración proteica de 1mg/ml). Tras el secado se realizó el equilibrado de la membrana durante 30 minutos en acetato de sodio 50 mM pH 4,5.

### **Identificación de actividad enzimática de ascorbato peroxidada (APX) mediante gel nativo de poliacrilamida (*in gel*)**

Primeramente se preparó un gel nativo de acrilamida al 10%, capaz de resolver adecuadamente las proteínas objeto de estudio. A la composición del tampón de electroforesis para correr geles en condiciones no desnaturizantes se añadió ácido ascórbico 2 mM que permitía estabilizar las APX y evitar la pérdida de su actividad. Una vez preparado el gel éste se pre-corrió a 15 mA durante 30 min con el objetivo de asegurar la entrada de ascorbato en el gel de electroforesis.

Para la extracción de las proteínas, se partió de nódulos frescos hasta obtener una concentración aproximada de 1 µg/µl, y se añadió, en frío, 1ml de la mezcla de extracción (Tabla 14). Una vez homogeneizadas las muestras, se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron los tubos a 14.000 x g durante 15 min a 4° C.

Posteriormente, en un tubo Eppendorf se añadieron 75 µl del tamón de carga (Tabla 10) y 125 µl del extracto enzimático. Finalmente, se cargaron 20 µl de muestra y se resolvieron las muestras en el gel a 30 mA.



**Tabla 14.** Composición la mezcla extractora de las APX

MOPS 30 mM
Ácido ascórbico 10mM
PVP soluble 0,6% (p/v)
EDTA-Na 5mM
DTT 10mM
1 ml de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma, cat. P2714)

*Revelado de la actividad APX*

Primeramente se equilibraron los geles con 20 ml del tampón de equilibrado (fosfato sódico 50 mM pH 7.0, Ácido ascórbico 2 mM) durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron los geles durante 20 minutos con el tampón de incubación (fosfato sódico 50 mM pH 7.0, ascorbato 4 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM) y tras los 20 minutos, se llevó acabo el lavado de los geles durante 1 minuto con el tampón de equilibrado. Después del lavado se añadió el tampón de revelado de la APX (fosfato sódico 50 mM pH 7,8, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 0,5 mM TEMED 28 mM). Durante todo el proceso de revelado se mantuvieron los geles en agitación.

**Peroxidación de lípidos: colorimetría de malondialdehído (MDA)**

Para la determinación del MDA(malondialdehído) se aplicó el protocolo establecido por Buege y Aust, 1978. Se hizo reaccionar el material vegetal fresco con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), lo que generó la aparición de un cromóforo de color rojo cuya capacidad máxima de absorción se produce a 535nm. Dado que la incubación que precisó el protocolo seguido podía generar diversos peróxidos orgánicos, se incluyó en el reactivo de TBA el reductor butil-hidroxítolueno (BHT), que se añadió justo antes de utilizar el reactivo de TBA.

Se pesó 0,1 g de nódulos frescos que se introdujeron en un mortero al que se añadió 1 ml del reactivo TCA-TBA-HCl (tricloroacético (TCA) 15%, tiobarbitúrico (TBA)

0,37% y HCl 0,25 M). Una vez homogeneizada la muestra, se transfirió a un tubo Eppendorf de 2.0 ml con rosca. Seguidamente los tubos se incubaron durante 30 minutos a 90°C. Pasado este período, los tubos se introdujeron en hielo y luego se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos. Del sobrenadante resultante de la centrifugación se midió la absorbancia a 535 nm y a 600 nm en el espectrofotómetro (MultiSpec-1501, SHIMADZU).

Para el cálculo de la concentración del MDA se aplicó la fórmula que aparece a continuación:

$$\frac{\text{nmol MDA}}{\text{g PF}} = \frac{(A_{535} - A_{600}) \times \text{mmol}}{1.56 \times 10^5 \text{ ml}} \times \frac{10^6 \text{ nmol}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.1 \text{ g PF}}$$

### Valoración del daño oxidativo a proteínas

La valoración del daño oxidativo a proteínas se llevó a cabo por el Grupo de Fijación de Nitrógeno y Estrés Oxidativo en Leguminosas del Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental Aula Dei (CSIC, Zaragoza).

El daño oxidativo a proteínas se determinó con el “OxyBlot protein oxidation kit” (Chemicon, Temecula, EEUU), basado en la reacción de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) generando las correspondientes hidrazonas.

Se homogeneizaron 100 mg de nódulos en 100 µl de tampon fosfato potásico (KPi) 100 mM (pH 7,0), Triton X-100 0,1% (v/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 mM y β-mercaptoetanol 2% (v/v). Los extractos se centrifugaron a 16000g durante 15 minutos en frío. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por el método Bradford y se derivatizó con DNPH la misma concentración de proteína para cada muestra. Para cada muestra se hizo un control negativo sin el DNPH, añadiendo la solución del control de derivatización (Kit). Tras ello, se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente y se paró la reacción añadiendo la solución de neutralización.

Los volúmenes empleados para la reacción aparecen en la tabla 15.

**Tabla 15.** Volúmenes empleados en la reacción para la valoración del daño oxidativo a proteínas

	Muestra (μl)	Control negativo (μl)
Muestra (μl)	5	5
SDS (12%) (p/v) (μl)	5	5
DNPH 1x (μl)	10	-
Solución control de derivatización 1x (μl)	-	10
Solución de neutralización (μl)	7,5	7,5

Tras el tratamiento, electroforesis (en geles de poliacrilamida al 12,5%) y transferencia de las muestras a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), la determinación del daño oxidativo se basó en la reacción antígeno-anticuerpo con el anticuerpo primario Anti DNP-hidrazonas de conejo.

### Análisis transcripcional

#### *Extracción de ARN con TRIzol*

Dada la problemática de trabajar con ARN por su gran labilidad, se trató de evitar en la medida de lo posible la presencia de ribonucleasas y otros contaminantes que pudieran interferir en la extracción.

La extracción de ARN se llevó acabo de acuerdo con el protocolo establecido por Gibco (BRL, Gaithersburg, MD).

Primeramente se trituró el material biológico, en este caso nódulos de plantas control y deficientes en boro, previamente congelado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Tras evaporarse el nitrógeno líquido, se homogeneizó el material (50-100 mg) en 1 ml de TRIzol tras precalentar el reactivo a 60°C.

Se mezcló mediante un agitador tipo “vortex” hasta la completa disolución del tejido, y se incubó el homogeneizado durante 5 minutos en hielo, tras lo cual se centrifugó durante 5 minutos en frío y a la máxima velocidad. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 200 μl de cloroformo mezclándose mediante vortex. Se incubó durante 3

minutos a 4°C, y se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 11000 rpm a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se transfirió a un nuevo eppendorf al que se añadieron 500 µl de isopropanol. Posteriormente se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 minutos a 11000 rpm a 4°C.

Se descartó el sobrenadante y se procedió al lavado del sedimento de ARN con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugó durante 5 minutos a 11000 rpm a 4 °C y se dejó secar el sedimento durante 10 minutos a temperatura ambiente hasta eliminar los restos de etanol.

Para la resuspensión del ARN se añadieron 40 µl de agua con DEPC (dietil pirocarbonato, producto capaz de degradar nucleasas y por ello altamente teratogénico). Se incubaron las muestras durante 10 minutos a 65°C y se dejaron las muestras O/N a 4°C. A continuación se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 11000 rpm y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf.

Para la preparación del agua con DEPC, se incubó agua destilada con DEPC al 0.1% (v/v) O/N. Posteriormente se autoclavó la solución durante 20 minutos a 120°C con el fin de degradar el DEPC.

#### *Cuantificación y purificación del ARN*

El ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop (ND 1000) a una  $\lambda=260$  nm y se verificó la calidad de la extracción separando las muestras extraídas en un gel de agarosa al 1%. De esta manera, se determinó la carga de ARN<sub>T</sub> 18 s en las alícuotas, lo que permitió comprobar la igualdad en la concentración de ARN en las diferentes muestras. Para ello se cargaron 2 µl de la alícuota de concentración 10 ng/µl mezclándose con 18 µl de H<sub>2</sub>O y 4 µl de tampón de carga transparente (TAE 6x, Ficoll 16%).

#### *RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)*

La determinación de los niveles de expresión de ciertos genes fue estudiada mediante la aplicación de la técnica RT-PCR basada en una retrotranscripción de una solución de ARN y la amplificación de la secuencia a estudiar a partir del cDNA obtenido. Para

llevar a cabo esta técnica se prepararon previamente diluciones de las muestras de ARN extraídas de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior. Éstas se alicuotaron hasta llevarlas a una concentración de 1ng/μl, realizando diluciones seriadas. Así, se uniformizó la concentración en todas las muestras extraídas y se redujo la posible pérdida de ARN por degradación o por quedar adherido a las paredes del tubo.

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el kit TITANIUM™One-Step RT-PCR.

Las condiciones de la reacción fueron también las establecidas por el protocolo (TITANIUM™One-Step RT-PCR), y se describen a continuación:

50°C	1 h	
94°C	5'	
94°C	30''	} x25 ciclos
OT°C	1'	
68°C	1'	
68°C	2'	
14°C	∞	

\*OT: Temperatura de anillamiento de los cebadores

Tras la reacción se tomaron 10 μl del producto de PCR, se mezclaron con 10 μl de agua bidestilada y 4 μl de tampón de carga transparente (TAE 6x, Ficoll 16%), y se cargaron en un gel de agarosa 1% disuelto en TAE 1x. Tras la tinción en bromuro de etidio, el gel fue observado en un analizador de geles Geldoc 1000C (Biorad). Como marcador de pesos moleculares se utilizó GeneRuler 1 Kb DNA ladder de Biotools.

La composición de 1 L de TAE 50x es:

- 242 g Tris base
- 57.1 ml ácido acético glacial
- 100 ml 0.5M ácido etilendiaminotetraacético (EDTA (pH 8.0))

## **Tissue Print**

Para determinar la distribución de ciertas proteínas sobre el tejido in vivo, se recurrió a la técnica de tinción de tejido, para lo cual se llevó a cabo el siguiente protocolo.

Se incubó la membrana de nitrocelulosa de 9cmx9cm en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,2 M durante 30 minutos. Tras la incubación, se dejó secar la membrana durante 30 minutos.

Posteriormente, se cortaron los nódulos longitudinalmente en dos mitades con el fin de impregnar la huella de los tejidos internos sobre la membrana. De esta manera, se continuó con la inmunodetección del contenido fijado en la membrana, utilizando los anticuerpos precisos.

A continuación se incubó la membrana siguiendo el mismo protocolo que el seguido para la detección inmunológica.

## **Microscopía**

### ***Fijación, deshidratación e inclusión de nódulos***

#### ***Fijación***

Para facilitar la entrada del fijador en la muestra, se realizaron cortes longitudinales en nódulos de las plantas crecidas bajo los distintos tratamientos nutricionales. Las muestras se fijaron utilizando glutaraldehído al 2.5% (v/v) en cacodilato sódico frío (4°C) a una concentración de 0.05 M a pH 7.4. Inmediatamente después, las muestras fueron desgasificadas dos veces durante 10 minutos, para mejorar la infiltración del glutaraldehído en las muestras, y, posteriormente, se incubaron los tubos a 4°C durante 2.5 h.

A continuación, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con cacodilato sódico 0.05 M (4°C) a pH 7.4.

### *Deshidratación*

Para la deshidratación de las muestras se realizaron incubaciones seriadas en etanol a 4°C :

- 30% etanol: 30 min a 4°C.
- 50% etanol: 30 min a 4°C.
- 70% etanol O/N a 4°C.
- 90% etanol: 30 min, a 4°C.
- 100% etanol: 60 min. a 4°C.
- 100% etanol: 30 min.a 4°C.

### *Inclusión LRWhite*

Tras la deshidratación, y para el estudio inmunológico, se infiltró el material añadiendo una mezcla de LRWhite/90% etanol (1:2) y se dejaron las muestras durante 3 h a 4°C. Tras la incubación, se descartó la mezcla y se añadió LRWhite/100% etanol (2:1), incubándose 4 horas a 4°C. Tras ello, se volvió a descartar la mezcla y se añadió LRWhite puro dejando incubar las muestras de nuevo O/N a 4°C. Posteriormente se dejaron las muestras en LRWhite puro durante 2-3 días, cambiando la solución cada día.

Por último, se colocó el bloque en una cápsula de gelatina (Gelatin Capsule size 4, Electron Microscopy Science) que se llenó con LRWhite, y se dejó incubar a 60°C durante 24 horas en las que transcurrió la polimerización. Finalmente se dejaron enfriar las muestras.

Las cápsulas con los nódulos incluidos obtenidas fueron talladas y cortadas en el Laboratorio de Microscopía de Transmisión del Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM utilizando un ultramicrotomo Ultracut-E-42 con mesa anti-vibratoria. Se realizaron cortes semifinos (0.5 µm) para el estudio histológico y la realización de inmunohistoquímicas y cortes ultrafinos (90 nm) sobre rejillas de níquel para la realización de inmunocitoquímicas y para el estudio ultraestructural.

### *Inclusión EPON 812*

Cuando el objetivo fue el estudio estructural, las muestras se embebieron en la resina epoxi EPON 812 (Burke CN, Geiselman CW., 1971) (Sigma). El proceso de infiltración comenzó con la adición de etanol 100% a las muestras deshidratadas. Tras 5 minutos, se retiró el etanol y se añadió óxido de propileno (100%) a las muestras, que se dejaron incubando durante 15 minutos, cambiando cada 5 minutos el reactivo. A continuación, se realizaron las siguientes incubaciones seriadas:

- Óxido de propileno - Resina Epoxi 2:1 1 hora
- Óxido de propileno - Resina Epoxi 1:1 1 hora
- Óxido de propileno - Resina Epoxi 1:2 1 hora

Finalmente se incubaron O/N las muestras en la resina Epoxi (100%) en campana y abiertos, para la eliminación de los posibles restos de óxido de propileno.

Finalmente, las muestras se pasaron a cápsulas Beem a la que se añadió resina fresca. En éstas tuvo lugar la polimerización de la resina con la muestra incluída, a 55°C durante 48 °C.

### ***Estudio histológico y ultraestructural***

Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina para el estudio estructural de la histología de los nódulos. Se disolvieron 50 mg de azul de toluidina en 5 ml de etanol al 70% (v/v). A la solución se le añadieron 9 volúmenes de otra de NaCl al 1% (p/v) en agua destilada. Los cortes se tiñeron durante 3 minutos, tras los cuales se retiró el exceso de colorante lavando con agua destilada.

Los cortes ya teñidos, se observaron en un microscopio óptico Olympus BH-2 y las fotos se tomaron con una cámara Lyca DC 300F para la captación de imágenes.

Para el estudio ultraestructural en cortes ultrafinos, las rejillas con los cortes pasaron por un proceso de tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo con el fin de aumentar el contraste. Para ello se incubaron las rejillas durante 10 minutos en acetato de uranilo



(2% p/v en agua destilada) y tras varios lavados con agua destilada, se post-tiñeron con citrato de plomo (a saturación) durante 45 segundos en una atmósfera reductora facilitada por NaOH. Se realizaron varios lavados con agua destilada para la eliminación del exceso de citrato de plomo.

### *Inmunohistoquímicas*

Con el fin de poder detectar determinados epítomos en cortes semifinos de nódulos depositados en portaobjetos multipocillo, se realizaron los siguientes pasos:

- 1) En una bandeja de plástico se encajaron dos pipetas sobre las que se apoyaron los portaobjetos. Además en un lateral de la bandeja se colocó papel empapado en agua para mantener la humedad.
- 2) Se lavaron los pocillos creando una corriente suave de agua destilada succionada con una bomba de vacío asociada con una punta azul de micropipeta (sistema que además sirve para retirar los distintos medios y secar los pocillos).
- 3) Posteriormente los cortes se equilibraron con una gota de TBS durante 30 minutos
- 4) Se saturaron los cortes con BSA al 2% disuelto en TBS durante 1 hora.
- 5) Tras la saturación, se incubaron los cortes durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en BSA-TBS (1:50 para monoclonales o 1:1000 para antisueros).
- 6) Se realizó el lavado por triplicado con TBS.
- 7) Se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal (partícula 10 nm) de la casa Sigma diluido 1:10 en BSA-TBS ( $\alpha$ IgG-rata o  $\alpha$ IgG-conejo, según anticuerpo primario) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 8) Una vez incubados con el anticuerpo secundario, se lavaron los cortes 3 veces con TBS.
- 9) Finalmente, se enjuagaron con agua bidestilada cada 3 minutos durante media hora.

Para evitar posibles acomplejamientos con pequeñas partículas disueltas en el agua, todas las soluciones fueron filtradas a través de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Para detectar las partículas de oro en el microscopio óptico, los cortes además pasaron por un proceso de revelado con plata utilizando el sistema R–Gent Silver Enhancement–LM (Aurion; Cat: #25520). Antes de empezar el proceso, se atemperaron tanto el “Realzador” y el “Revelador” que componen el sistema. Una vez atemperados, se mezclaron en relación 1:1, y con la solución resultante se cubrieron los cortes y se dejó desarrollar la reacción hasta la aparición de la señal en forma de precipitado de plata en el corte.

Al igual que para el estudio estructural, los cortes ya teñidos se observaron en un microscopio óptico Olympus BH-2 con una cámara digital Leica DC 300F para la captación de imágenes.

#### *Inmunocitoquímicas*

Al igual que los cortes semifinos de nódulos, los cortes ultrafinos sobre rejillas de níquel se procesaron para su inmunomarcaje, lo que transcurrió siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- 1) Primeramente se bloquearon las rejillas colocando cada una en una gota de BSA (20 mg/ml) disuelto en TBS durante 1 hora a 37°C. Se pusieron gotas sobre una tira de parafilm de aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ . Cada de rejilla se colocó en una gota de solución de bloqueo distinta, de tal forma que la sección o corte quedó en contacto con la solución. Si en algún momento del procesamiento la rejilla quedaba sumergida por completo en la gota, se procuró colocar el corte boca arriba y completamente sumergido desde ese momento y hasta el final del procesamiento.
- 2) Tras el bloqueo, las rejillas se incubaron en una gota de BSA (20 mg/ml) disuelto en TBS con el anticuerpo primario a la dilución adecuada durante 1 h a 37°C. La dilución de anticuerpo empleada dependió del anticuerpo empelado. Para monoclonales se utilizó una dilución 1:100, mientras que para antisueros la dilución empleada fue de 1:500.

- 3) Una vez incubados las rejillas con el anticuerpo primario, se lavaron durante 5 minutos, 3 veces, en BSA (2 mg/ml) disuelto en TBS, a temperatura ambiente y en agitación, para lo cual se colocaron 5 gotas de 100 µl sobre una tira de parafilm y se fueron pasando las rejillas de una gota a otra hasta culminar lo lavados.
- 4) Posteriormente, se incubaron las rejillas con el anticuerpo secundario conjugado en oro coloidal (partícula 10 nm) de la casa Sigma diluido 1:25 en TBS-BSA (2 mg/ml) durante 1 hora a 37°C.
- 5) Se lavaron las rejillas 5 veces durante 3 minutos en TBS-BSA (2 mg/ml) a temperatura ambiente.
- 6) A continuación se lavaron las rejillas 3 veces durante 1 minuto en TBS-BSA (2 mg/ml) con Triton X-100 al 0.1% (v/v), a temperatura ambiente. En este paso se tuvo la precaución de no dejar las rejillas más de 1 minuto en cada uno de los 3 lavados.
- 7) Finalmente se lavaron 3 veces durante 3 minutos, en agua destilada a temperatura ambiente.

Tras el proceso de inmunomarcado las rejillas pasaron por un proceso de postinción con acetato de uranilo y citrato de plomo con el fin de aumentar el contraste, siguiendo el protocolo descrito anteriormente para el análisis ultraestructural. Del mismo modo, las rejillas estuvieron dispuestas para su observación en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010 (100 KV). La toma de fotografías de los cortes se realizó con la cámara BioScan de Gatan y el sistema de análisis de imagen empleado fue DigitalMicrograph 3.1, lo que se llevó a cabo en el Laboratorio de microscopía electrónica de transmisión del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid.

Por cada muestra a analizar, se tomó, como control negativo, la rejilla no incubada con anticuerpo primario.

## **Experimentos con pez cebra**

### ***Crecimiento de embriones***

Se partió de embriones obtenidos a partir de peces adultos en estado reproductivo de acuerdo con la metodología descrita en [http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB\\_home.apg](http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB_home.apg).

Aproximadamente 1 hora post-fecundación, se transfirieron unos 30 embriones a placas Petri con 20 ml de medio de crecimiento Hank. El crecimiento tuvo lugar en una incubadora a 28°C.

### ***Tratamientos de deficiencia de B***

Para lograr obtener el medio de desarrollo de embriones libre de B, se trató el medio de crecimiento Hank durante 48 h a 28°C y en agitación, con Amberlita IRA-743 de Sigma Co (Asad y col., 1997).

Para eliminar trazas de boro, y dependiendo del estadio de desarrollo en el que se quería inducir la deficiencia de B, los embriones se lavaron 6 veces en medio libre de boro y se transfirieron a placas Petri en el mismo medio para posteriormente incubarlos a 20°C.

### ***Identificación de proteínas***

Para obtener los extractos proteicos de pez zebra, se homogeneizaron los embriones en tampón Laemmli 2x, y posteriormente se hirvieron las muestras durante 10 minutos a 95°C. A continuación se llevó acabo la electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida y tinción de los mismos, en las mismas condiciones descritas anteriormente para los experimentos con material vegetal.

Las bandas de interés se pre-identificaron mediante MALDI TOF (Resultados, Tabla 19).

### ***Fotografías en lupa***

Las fotografías de los embriones y peces de los distintos tratamientos y en diferentes estadios de desarrollo, se realizaron utilizando la lupa Leica MZ7<sub>5</sub> capturándose las imágenes con la cámara NIKON Coolpix 995.



## ***RESULTADOS***

---





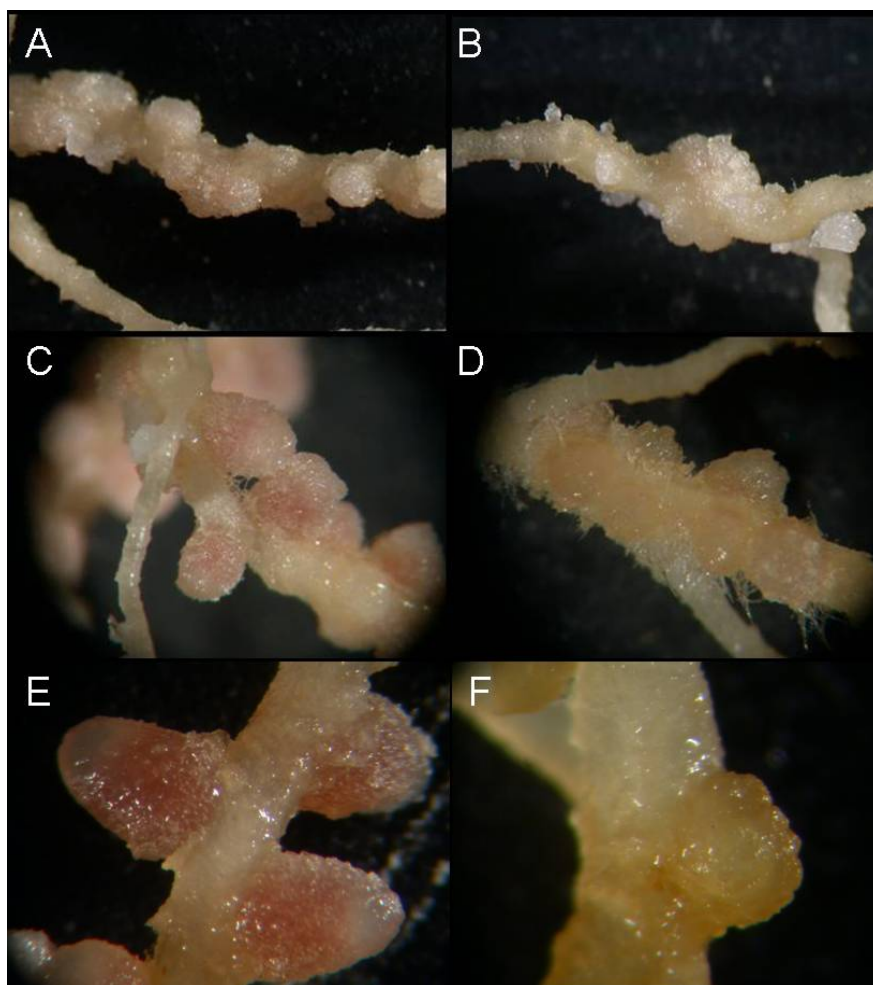
## RESULTADOS

### 1. Caracterización fenotípica de la simbiosis rizobio-leguminosa bajo deficiencia de boro

Al igual que ya se ha descrito en estudios previos realizados por nuestro grupo en sistemas rizobio-leguminosa (Bolaños y col., 1994; Bonilla y col., 1996a), la deficiencia de B condujo al desarrollo de nódulos no funcionales en leguminosas. Por ello, el objetivo de estos primeros ensayos fue el describir, desde un punto de vista morfológico, los efectos de la deficiencia de B sobre el estado de desarrollo de los nódulos.

La figura 17 muestra el aspecto de los nódulos de plantas de guisante inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, control (+B) o deficientes en B (-B), durante las tres primeras semanas de su desarrollo. Los nódulos indeterminados de guisante aumentan de tamaño y cambian su forma de esférica, en las primeras etapas de actividad meristemática a cilíndrica, a causa del cese de mitosis en células infectadas e inicio de los procesos de diferenciación celular. Además, experimentan un cambio de coloración, de incoloros-blanquecinos cuando son inmaduros, a rosados (color debido a la presencia de leghemoglobina) cuando son maduros, finalizando en verde-pálido (por oxidación y destrucción de la leghemoglobina (Lehtovaara y Pertilä, 1978)) cuando senescen, proceso que no experimentan los nódulos control hasta las tres semanas de desarrollo.

Sin embargo, el análisis morfológico de los nódulos deficientes de boro respecto a los nódulos control a lo largo del tiempo (Tabla 16), permite caracterizar a la deficiencia en B como causante de un proceso de alteración del desarrollo, ya que apenas llegan a madurar nódulos rosados en plantas deficientes de B, adquiriendo una apariencia característica de tejidos necróticos, al tornar directamente de color pálido a parduzco (Fig. 17).

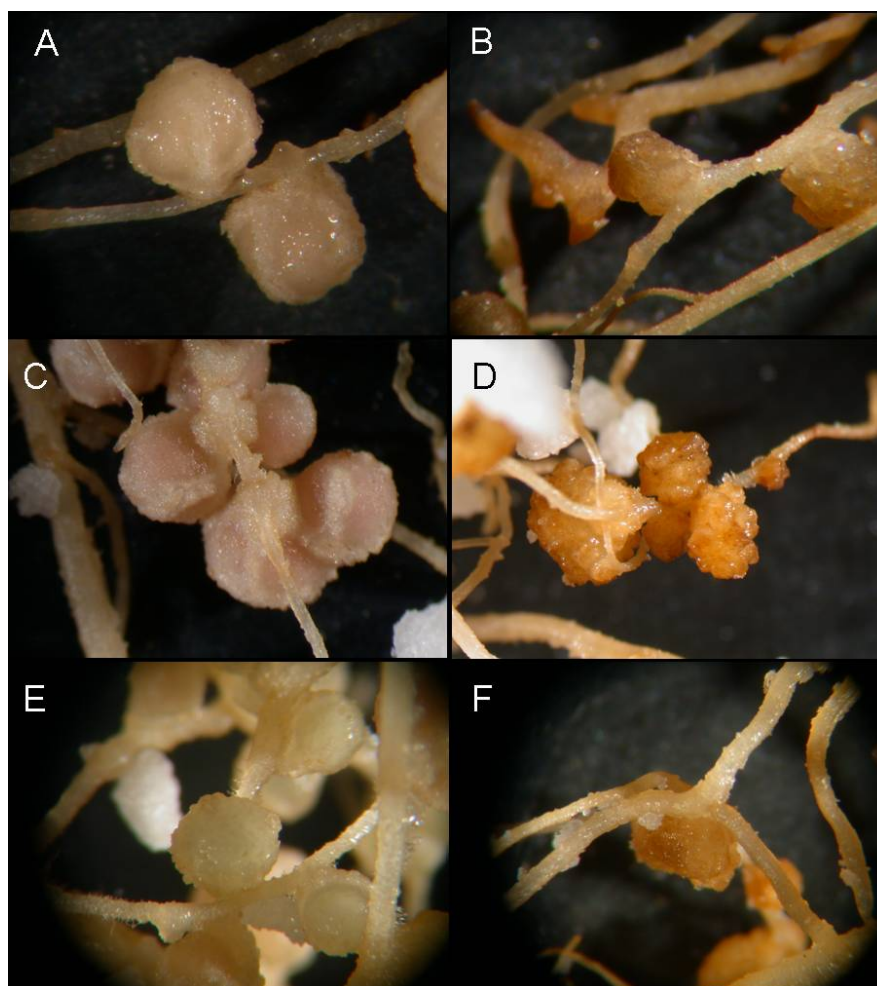


**Figura 17.** Nódulos de guisante (*Pisum sativum*) de 1 semana control (A) y deficiente en B (B), de 2 semanas control (C) y deficiente en B (D) y nódulos de 3 semanas control (E) y deficientes en boro (F).

Semana	Tratamiento	Nódulos blancos (inmaduros)	Nódulos rosados (funcionales)	Nódulos pardos (senescentes)	Nódulos verdes (senescentes)
Semana 1	Control	20 ± 8	-	-	-
	-B	11 ± 3	-	-	-
Semana 2	Control	5 ± 2	140 ± 32	-	-
	-B	11 ± 6	-	110 ± 11	-
Semana 3	Control	-	187 ± 35	-	-
	-B	-	-	152 ± 17	-
Semana 4	Control	-	63 ± 12	-	117 ± 23
	-B	-	-	160 ± 14	-
Semana 5	Control	-	-	-	185 ± 21
	-B	-	-	154 ± 9	-

**Tabla 16.** Análisis morfológico de los nódulos deficientes de boro (-B) y control a lo largo del tiempo

Un efecto similar de la deficiencia de B se puede observar en el desarrollo de nódulos determinados de judía inoculada con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* B625 (Figura 18). Al igual que en guisante, los nódulos de judía deficiente en B se desarrollan anormalmente y degeneran de forma prematura.



**Figura 18.** Nódulos de judía (*Phaseolus vulgaris*) de 1 semana control (A) y deficiente en B (B), de 2 semanas control (C) y deficiente en B (D) y nódulos senescentes control (E) y deficientes en boro (F).

A la vista de estas observaciones previas, los estudios que se presentan a continuación, fueron encaminados a la detección, identificación y análisis de proteínas, glicoproteínas y/o otros glicoconjugados que presentaran un comportamiento diferente durante el desarrollo de nódulos control y deficientes en B, y que pudieran estar potencialmente implicados en el desarrollo de la simbiosis y, por tanto, ser potencialmente responsables de las alteraciones del desarrollo de los nódulos deficientes en B. Los estudios se realizaron principalmente en nódulos indeterminados de guisante, ya que en ellos

aparecen simultáneamente zonas en las que se presentan las distintas fases de desarrollo de la simbiosis: meristemo apical, zona de infección, zona de diferenciación de simbiosomas, zona de fijación de nitrógeno y, posteriormente, zona de senescencia. No obstante, algunas de las observaciones realizadas en guisante se comprobaron además en judía, con el objetivo de tratar de extenderlas también a nódulos determinados.

## **2. Captación e identificación de posibles ligandos de boro en nódulos.**

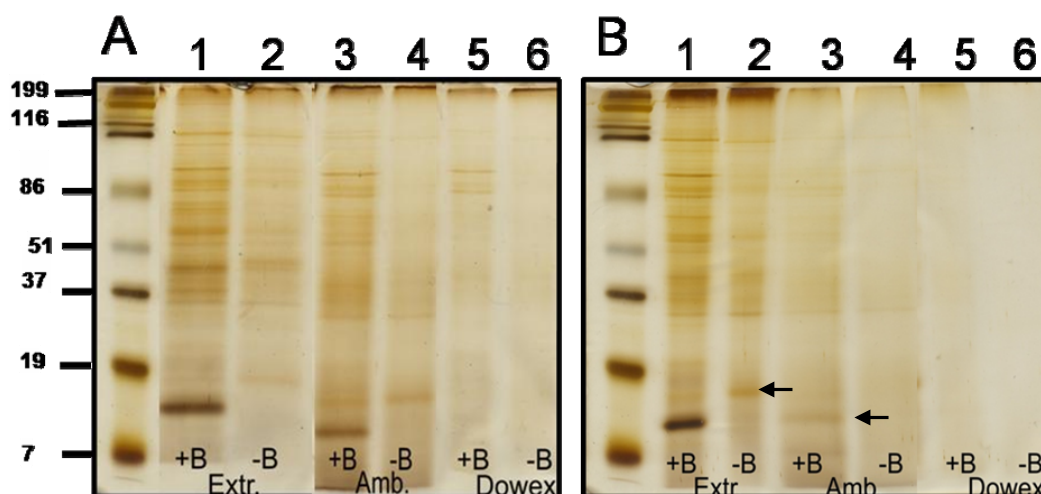
Como se ha mencionado en la introducción, actualmente la capacidad del ión borato para formar complejos con grupos *cis*-diol dando estabilidad y funcionalidad a moléculas complejas, se considera clave para entender cualquier función del boro en plantas y otros organismos (Bolaños y col., 2004b). Por ello, el comienzo de nuestros estudios se basó en el desarrollo de una metodología que sirviera como punto de partida para aproximarnos a la detección e identificación de posibles macromoléculas unidas a borato.

### **2.1. Captación de posibles ligandos mediante el uso de una resina específica de unión a borato**

De acuerdo con la metodología descrita anteriormente, se utilizó Amberlita IRA-743, resina que liga específicamente iones borato, para la captación y detección de posibles ligandos de boro. Aunque esta resina puede captar o liberar B estableciendo un equilibrio con el medio (lo que hace pensar en la posible pérdida, durante los lavados, de ciertas asociaciones del B a la misma), una fracción de ión borato (con los posibles ligandos que lleve enlazados) quedaría siempre asociada a ella. Como control negativo se utilizó la resina Dowex 1-X8, de intercambio aniónico.

Se obtuvieron extractos de nódulos de guisante 3 semanas después de la inoculación con *R. leguminosarum*, coincidiendo con el pleno desarrollo de los mismos en condiciones control, y se incubaron con Amberlita. Tras la incubación de los extractos de nódulos con la resina, y los sucesivos lavados tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, el material asociado a las resinas se solubilizó con tampón Laemmli y se separó por electroforesis

en geles de poliacrilamida-SDS. Como se puede observar en la figura 19, la tinción con plata de los extractos incubados con las resinas y lavados cuatro veces, mostró bandas proteicas asociadas a Amberlita, pero también a Dowex, por lo que decidimos incrementar el número de lavados hasta eluir completamente los péptidos asociados al Dowex. Tras doce y sucesivos lavados sólo se detectaron bandas asociadas a la Amberlita, lo que permitió descartar uniones inespecíficas a esta resina (Fig.19).



**Figura 19.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-(PAGE) teñido con plata para detectar polipéptidos. 16 A) Calles 1 y 2, extractos crudos de nódulos control y deficientes en B. Calles 3 y 4, sedimentos de extractos control o deficientes en B incubados con Dowex y lavados 4 veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 control y deficientes en B. Calles 5 y 6, sedimentos de extractos control o deficientes en B incubados con Amberlita y lavados 4 veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Figura 16 B) Calles 1 y 2, extractos crudos de nódulos control y deficientes en B. Calles 3 y 4, sedimentos de extractos control o deficientes en B incubados con Amberlita y lavados 12 veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 control y deficientes en B. Calles 5 y 6, sedimentos de extractos control o deficientes en B incubados con Dowex y lavados 12 veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Las cargas proteicas se igualaron a 0, 3 µg/µl.

La desaparición de bandas asociadas a la resina Dowex (Fig.19 B, calles 5 y 6) respecto al bandeo que permaneció en las calles correspondientes a la resina Amberlita, junto con la menor capacidad de asociación a la resina que presentaron los extractos de nódulos deficientes en B, sugería que la metodología podría ser válida como método de aproximación para captar posibles ligandos de B o de proteínas fuertemente asociadas a ligandos de B que fuesen capturados por la Amberlita.

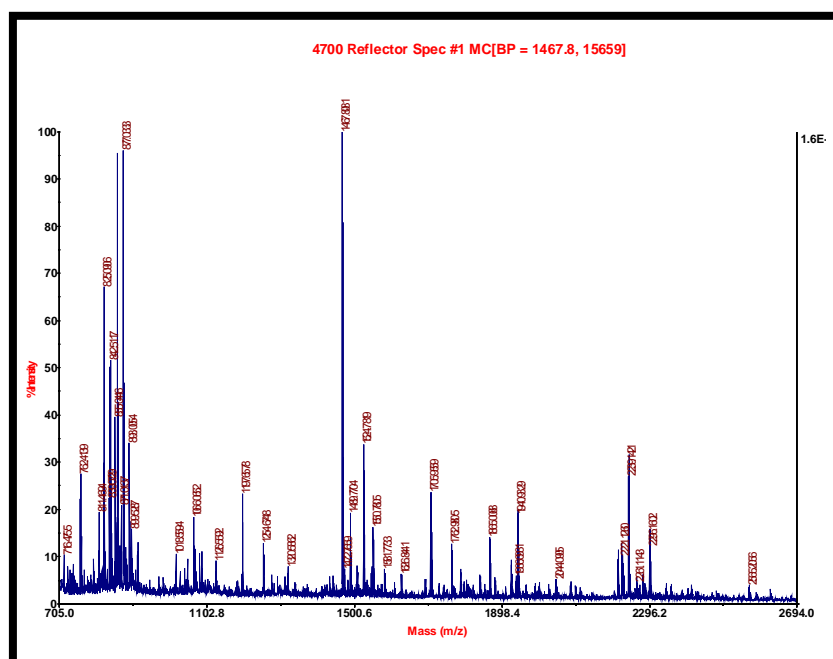
Además de las asociadas a Amberlita, la figura 19 B muestra algunas bandas no asociadas pero inducidas de forma muy intensa en nódulos deficientes en B,

especialmente una de las bandas inducidas, de unos 17 kD (calle 2, punta de flecha), por lo que, además de los posibles ligandos de B consideramos interesante identificar estas proteínas fuertemente inducidas en ausencia del micronutriente.

## 2.2. Identificación de posibles ligandos de B.

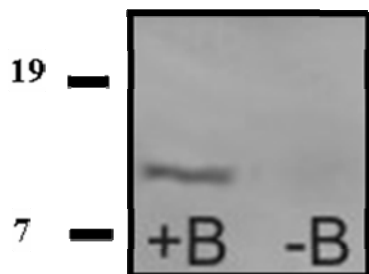
Para el análisis de las bandas proteicas asociadas a Amberlita se recurrió a la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*), para el análisis de péptidos procedentes de la digestión con tripsina de bandas eluídas de réplicas de los geles mostrados en las figuras anteriores. Para dicho análisis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, tinción compatible con la técnica de identificación.

De las bandas asociadas a Amberlita (Fig.19) sólo se pudo identificar de forma fiable, debido a la intensidad de la misma, una banda de aproximadamente 16 kD que aparecía como mayoritaria en muestras de extractos de nódulos control (Fig. 19, calle 3, punta de flecha), y que no era detectada en nódulos deficientes en B. Con el fin de identificarla, se llevó a cabo el análisis del espectro de masas (Fig. 20) obtenido por MALDI TOF, y de acuerdo con los parámetros del algoritmo que determina MASCOT ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.htm](http://www.matrixscience.com/search_form_select.htm)), se identificó como leghemoglobina 5-10 de *Pisum sativum* (guisante) (Tabla 17, banda 6). En cualquier caso, no es posible descartar que en la misma banda pudieran presentarse otras leghemoglobinas puesto que el análisis del espectro daba presencia de otras leghemoglobinas, coincidentes con ésta en tamaño, como la leghemoglobina 120-1.



**Figura 20.** Espectro resultante de la digestión con tripsina y la espectrometría de masas (MALDI TOF) para el análisis de la banda de 16 kD correspondiente a Leghemoglobina de *Pisum sativum*

El uso de un suero anti-leghemoglobina de guisante para localizar dicha proteína, tras la electrotransferencia de los geles a membranas de nitrocelulosa (“western-blots”), permitió confirmar esta identificación (Figura 21).

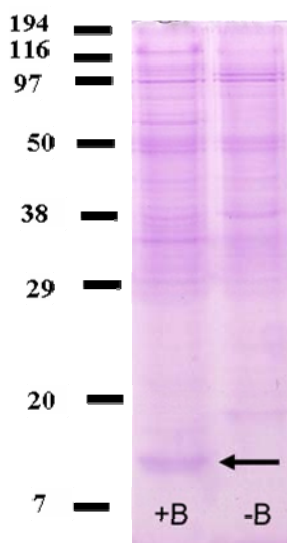


**Figura 21.** Detección inmunológica de la leghemoglobina 5-10 asociada a amberlita incubada con extractos de nódulos de guisante +B (control), pero ausente en extractos de nódulos -B (deficientes), y lavada 12 veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, tras electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. La carga proteica total fue de 9 µg diluida 1:100.

Observando los extractos de nódulos deficientes en B, se puede establecer que la presencia de esta proteína, que puede estar asociada directamente al B o a algún ligando de B, por su aparición en los extractos incubados con amberlita, no aparece en cantidades detectables en nódulos -B de 3 semanas. Para comprobar si esta ausencia de leghemoglobina ocurría también en nódulos determinados, realizamos electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS con extractos de nódulos de judía de 3 semanas (Fig.22). Como se puede observar, la banda correspondiente a la movilidad característica de la leghemoglobina (flecha), mayoritaria en extractos de nódulos +B, no apareció en cantidades detectables en nódulos -B (Fig.22). No se presentó inmunodetección, ya que



el antisuero de guisante no dio señal en judía, y no se dispuso de un anticuerpo específico frente a leghemoglobina de judía.



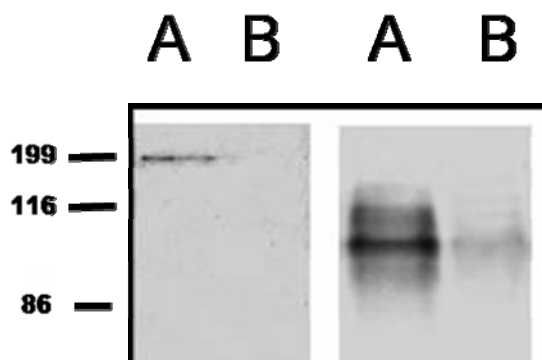
**Figura 22.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-(PAGE) teñido con Coomassie de muestras de nódulos de Judía (*Phaseolus vulgaris*) 3 semanas después de la inoculación, control y deficientes de B. La carga proteica total fue de 9 µg.

La localización de proteínas por tinciones genéricas como la de nitrato de plata o azul de Coomassie, para su posterior identificación por MALDI TOF es aplicable sólo a aquellas proteínas con una presencia suficientemente elevada en los extractos como para ser detectadas por dichas tinciones, pero la sensibilidad de esta técnica es insuficiente para detectar proteínas minoritarias u otras macromoléculas no teñibles por los compuestos mencionados. Para tratar de identificar otros componentes de nódulos asociados a la Amberlita y, por tanto, posibles ligandos de B, utilizamos una serie de anticuerpos monoclonales y antisueros que identifican glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos de origen vegetal o bacteriano, importantes durante el desarrollo de la simbiosis. En la figura 23 sólo se muestran los resultados de aquellos ensayos que dieron resultados positivos.

Concretamente, y como era de esperar por ser una molécula conocida por interactuar con B, pudimos detectar ramnogalacturonano II (RGII) asociado a amberlita. Además, de forma interesante, apareció como posible ligando de B la glicoproteína AGPE (“arabinogalactan protein extensin”, específica de leguminosas) (antígeno MAC265) secretada al lumen de los canales de infección y a los espacios intercelulares de las células del córtex para cerrar la barrera de difusión de oxígeno. No obstante, aunque de forma débil, esta glicoproteína también apareció asociada a Dowex, si bien, la alta



intensidad de la señal de MAC 265 ligada a la Amberlita, indica mayor afinidad por esta resina específica para capturar B.



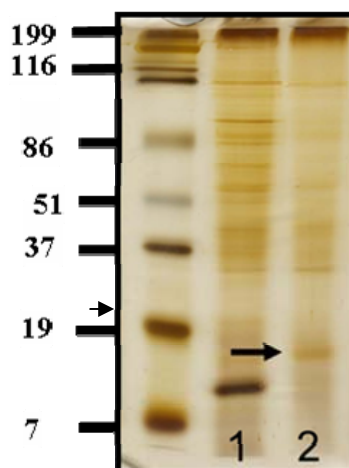
**Figura 23.** Inmunodetección con anti-RGII y MAC265 de ramnogalacturonano II y AGPE respectivamente, en membranas de nitrocelulosa tras la transferencia de geles de poliacrilamida-SDS de muestras de Amberlita (A) y de Dowex (B) incubada con extractos de nódulos control de 3 semanas tras la inoculación, y tras lavar el pellet 12 veces con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

### 3. Identificación de proteínas inducidas por la deficiencia de B en nódulos.

Como mencionamos anteriormente, además de moléculas asociadas a Amberlita, nos pareció interesante identificar aquellas proteínas inducidas por deficiencia de B, puesto que podrían explicar algunos de los efectos descritos sobre el anormal desarrollo de la simbiosis.

Como observamos en la figura 24, aparecía una banda (señalada con una flecha), que presentaba una fuerte inducción en deficiencia de B. En el análisis de la misma mediante MALDI TOF, se logró identificar como una proteína de *Pisum sativum* (guisante) inducida en procesos patogénicos, concretamente, una proteína perteneciente a la familia de proteínas PR10.

**Figura 24.** Análisis de proteínas inducidas en muestras de extractos de nódulos deficientes de B respecto a las muestras control. La flecha indica una banda de unos 17 kD fuertemente inducida en nódulos -B (calle 2), que no se detecta con plata en nódulos +B (calle 1). La carga proteica total fue de 9 µg.



Para establecer de forma más precisa las diferencias en el patrón proteico de nódulos control y -B, y puesto que numerosas proteínas de la familia PR10 tienen una movilidad electroforética similar (Iturriaga y col., 1993), para poder discernir la pureza de la banda identificada y discriminar aquellas proteínas que pudieran coincidir por tamaño relativo en la misma, se realizó una electroforesis bidimensional de los extractos de nódulos (Figura 25). Ésta mostró un perfil proteico claramente distinto de muestras control respecto a las muestras deficientes de B.

El resultado del análisis de las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI TOF viene recogido en la tabla 17. En ésta se muestran tanto las proteínas que aparecen en condiciones control y que no se presentan en condiciones deficientes en B (por no presentarse dada la reducción en la capacidad infectiva o por la represión de las mismas en condiciones de deficiencia), como aquellas inducidas específicamente en condiciones deficientes en B.

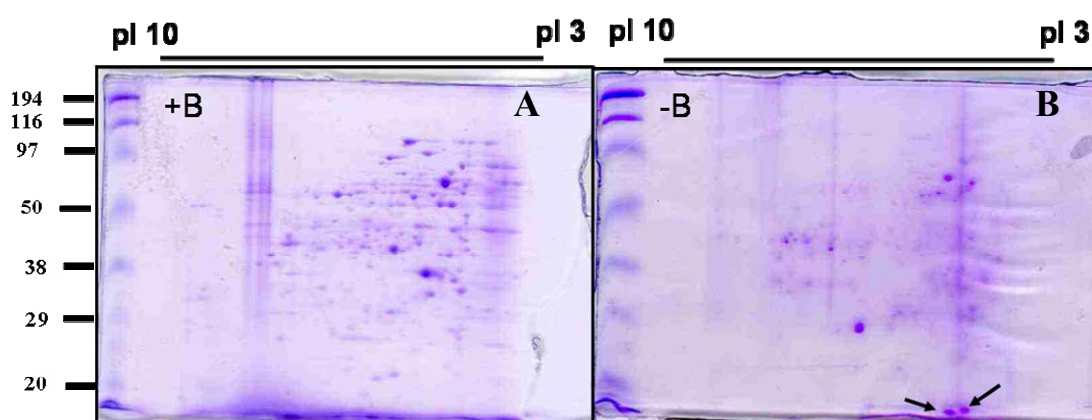
Todas las proteínas que aparecían en condiciones control, salvo la banda número 6, correspondieron a proteínas de *Rhizobium leguminosarum* 3841, como cabía esperar dada la reducción de la infección bajo deficiencia de B. La banda número 6 correspondió a distintas leghemoglobinas de guisante.

Spot	Acceso	Proteína identificada	Organismo	Masa nominal teórica (M <sub>r</sub> ) kDa	Masa experimental aproximada (kDa)	Cobertura de secuencia (%)	Score*	Número de péptidos	pI
1	Q1M7Z2_RHIL3	Putative nitrogenase iron protein	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	32,361	37	52%	105	12	5.09
2	Q1MAZ2_RHIL3	Putative ATP synthase beta chain	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	50,885	62,3	28%	106	9	5.03
3	Q1MKV8_RHIL3	Putative maturation protein	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	47,377	62	26%	72	7	5,12
4	Q1MKX4_RHIL3	Putative 60 kDa chaperonin (Protein cpn60)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	57,865	70	31%	157	7	5.07
	S65596	Heat shock protein 60	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	57,847	70	28%	138	5	5,11
5	Q1MAZ0_RHIL3	Putative ATP synthase alpha chain (EC 3.6.3.14)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	54,776	66	39%	171	10	6
6	LGB3_PEA	Leghemoglobina Lb120-1	<i>Pisum sativum</i>	15,801	15,8	51%	72	5	5,57
	LGB6_PEA	Leghemoglobina Lb120-34	<i>Pisum sativum</i>	15,815	15,8	51%	72	4	5,57
	T06221	Leghemoglobina 1-4	<i>Pisum sativum</i>	15,946	15,8	51%	72	4	5,57
	T06217	Leghemoglobina 1-2	<i>Pisum sativum</i>	15,932	15,8	51%	72	5	5,57
	LGB2_PEA	Leghemoglobina Lb5-10	<i>Pisum sativum</i>	15,796	15,8	40%	68	3	6,34
	T06216	Probable leghemoglobina	<i>Pisum sativum</i>	15,927	15,8	40%	68	3	6,29
7	Q1MAL8_RHIL3	Putative aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (cepa 3841)	97,84	97	38%	423	23	5,40
8	S42649	Pathogenesis-related protein 17	<i>Pisum sativum</i>	16,619	16,48	59%	76	5	5,07
9	T06527	Pathogenesis-related protein 10	<i>Pisum sativum</i>	16,794	16,49	37%	57	4	4,94

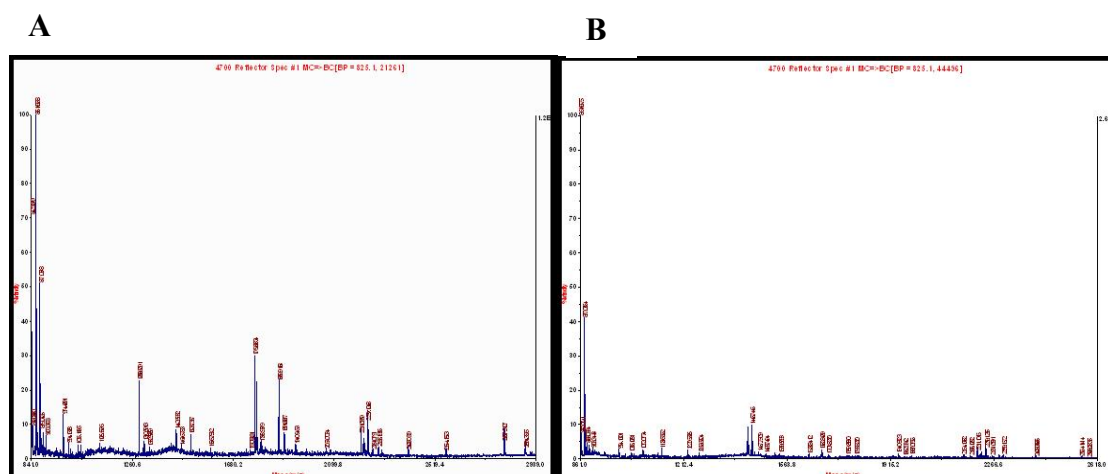
\* Score obtenido de acuerdo con el algoritmo Mascot (Perkins D. N, 1999) (www.matrixscience.com)

**Tabla 17.** Muestras de proteínas presentes en nódulos de plantas control (de la banda 1 a la 7) e inducidas bajo deficiencia de B (bandas 8 y 9) analizadas mediante espectrometría de masas MALDI TOF

Si atendíamos a aquellas proteínas que se inducían en deficiencia de B, resaltaban dos manchas (“spots”) (Fig.25 B, flechas), que eran coincidentes en tamaño con la banda previamente descrita (aproximadamente 17 kD) pero con distinto punto isoeléctrico (4,94 y 5,07, respectivamente) y distinta masa nominal (16794 y 16619, respectivamente). Para su identificación, estas dos proteínas fueron analizadas mediante MALDI TOF (Fig.17). Ambas correspondieron a proteínas de guisante inducidas por patogénesis de la familia PR10, como ya identificamos en geles de proteínas de una dimensión. Una se identificó concretamente como PR10.1 (Fig.26 A) y la otra se identificó como ABR17 (Fig. 26 B).

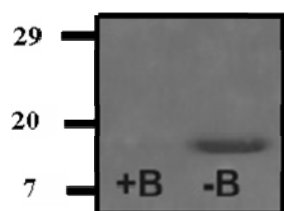


**Figura 25.** Electroforesis 2D de proteínas correspondientes a muestras de extractos de nódulos control (A) y deficientes de B (2). Aparecen (B) indicadas las dos proteínas analizadas por MALDI-TOF, que se identificaron como proteínas de *Pisum sativum* (guisante) relacionadas con patogénesis. La carga proteica total fue de 125 µg.



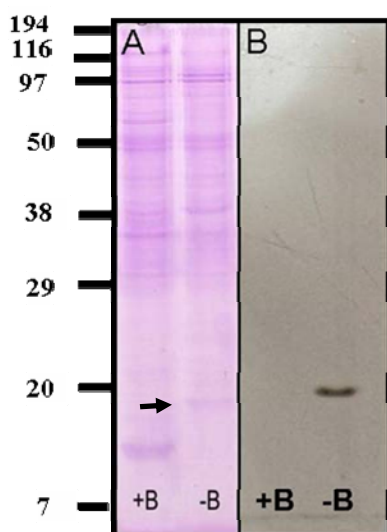
**Figura 26.** Espectros resultantes de la digestión con tripsina y la espectrometría de masas (MALDI TOF) para el análisis de los “spots” de Fig A) 16,794 kD y Pi 4,94, identificado como la proteína PR10.1 de *Pisum sativum* y (Fig. B) de 16,619 kD y de pI 5,07, identificado como la proteína ABR17 de *Pisum sativum* (Fig B).

El uso de un antisuero obtenido contra-ABR 17, permitió confirmar la inducción de esta proteína en nódulos de guisante (*Pisum sativum*) deficientes en B (Fig. 27).



**Figura 27.** Inmunodetección con anti-ABR17 sobre extractos de nódulos de 3 semanas control (+B) y deficientes en B (-B), separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La carga proteica total fue de 9 µg. diluidos 1:100

Dada la inducción de proteínas relacionadas con patogénesis en nódulos indeterminados de guisante bajo condiciones de deficiencia en B, se realizó un análisis de este efecto en nódulos determinados de judía. Como se puede observar en la figura 28, en extractos de nódulos de judía deficientes en B, apareció la inducción de una banda de similar movilidad electroforética que la de las PR10 detectadas en nódulos -B de guisante (Fig.28 A, flecha). Además, esta banda fue reconocida también por el anticuerpo frente a ABR17 de guisante (Fig.28 B), por lo que podemos postular que la aparición de estas PR<sub>S</sub> (Pathogenesis Related Proteins, en inglés) en nódulos deficientes de B ocurre independientemente del tipo de desarrollo, indeterminado o determinado, del nódulo.



**Figura 28.** A) Gel de proteínas de extractos de nódulos de judía (*Phaseolus vulgaris*) de 3 semanas B) Inmunodetección de ABR17 sobre extractos de nódulos de judía de 3 semanas separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La carga proteica total fue de 9 µg.

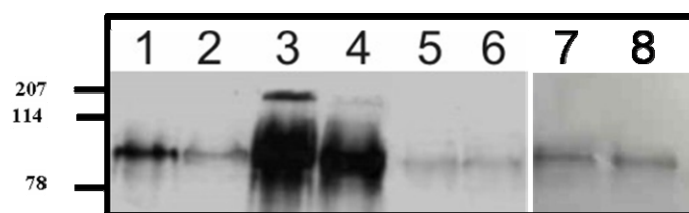
Una vez realizados los análisis para identificar estos componentes moleculares, que bien pueden interaccionar con B o son inducidos en deficiencia del micronutriente, se procedió a un estudio detallado de los mismos en relación con los procesos en los que se

ven implicados durante el desarrollo de la simbiosis, como la infección o los mecanismos de control de la concentración de oxígeno.

#### **4.-Inhibición de la infección e inducción de respuestas de defensa en la rizobio-leguminosa en deficiencia de B.**

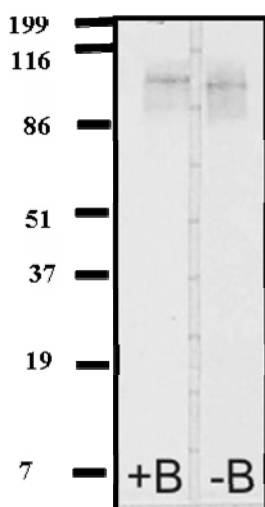
##### **4.1. Inhibición de la infección por efecto de la deficiencia de B sobre las propiedades de la glicoproteína AGPE secretada al canal de infección.**

Estudios previos de nuestro equipo demostraron que la deficiencia de B conduce al desarrollo de canales de infección que abortan prematuramente y a una inhibición de la infección (Bolaños y col., 1996; Redondo-Nieto y col., 2001). Utilizamos de nuevo la resina quelante de B, Amberlita IRA-743, y se realizó el inmunoensayo con MAC265 para detectar AGPE (mostrada anteriormente como posible ligando de B por su asociación a esta resina) tras la electrotransferencia de las muestras de extractos tanto de nódulos control como deficientes en B, con el objetivo de estudiar la capacidad de asociación a la resina de los antígenos reconocidos por MAC265 procedentes de nódulos +B o -B. Tras la reacción con MAC265 (Fig.29), se observó, asociada a amberlita, una banda de 95 kDa de peso molecular relativo siendo más intensa en extractos de nódulos control (calle 1) que en los derivados de nódulos -B (calle 2), en los que la intensidad de la señal era prácticamente similar a la ligada a la resina Dowex (calles 5 y 6). Pero además de ésta, apareció una banda de menor movilidad electroforética (en la zona de 175 kDa de peso molecular relativo) en extractos no ligados a amberlita (calle 3), cuya intensidad era mucho más débil en extractos deficientes en B (calle 4). Dicha banda resultó ser específica de nódulos puesto que no apareció en extractos de raíz +B o -B (calles 7 y 8).



**Figura 29.** Extractos solubles de nódulos incubados con Amberlita o Dowex y extractos de raíz control y deficiente, marcados con MAC 265 tras electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y electrotransferencia a nitrocelulosa. Calle 1: Fracción de nódulo control asociada a Amberlita. Calle 2: Fracción de nódulo -B asociada a Amberlita. Calle 3: Fracción de nódulo control no asociada a Amberlita. Calle 4: Fracción de nódulo deficiente de B (-B) no asociada a Amberlita. Calle 5: Fracción de nódulo control asociada a Dowex. Calle 6: Fracción de nódulo -B asociada a Dowex. Calle 7: Extracto de raíz control. Calle 8: Extracto de raíz deficiente de B.

Paralelamente se realizó la inmunodetección de AGPE con MAC 265 en extractos solubles de nódulos determinados de judía, donde el desarrollo de canales de infección es mínimo y restringido a los eventos muy tempranos de infección. Se observó la presencia exclusiva de la banda de 95 kDa tanto en nódulos control como deficientes en B (Fig.30), por lo que interpretamos que la banda de mayor peso molecular de nódulos de guisante podría ser característica de canales de infección.



**Figura 30.** Extractos solubles de nódulos de judía control (+B) o deficientes de B (-B), 2 semanas después de la inoculación, marcados con MAC265, tras electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y electrotransferencia en membranas de nitrocelulosa. La carga proteica total fue de 9 µg.

Puesto que la banda de alto peso molecular relativo reconocida por MAC 265 tiene la misma movilidad que RGII, según se muestran las figuras 29 (para la AGPE) y 23 A (para RGII), se podría pensar en una asociación entre estos dos componentes, por lo que realizamos ensayos de inmunoprecipitación para detectar posibles interacciones entre AGPE y RGII que pudieran justificar la aparición de dicha banda (Figura 31). Utilizando MAC 265 para purificar AGPE en ensayos de inmunoprecipitación de extractos solubles y pellet, fundamentalmente bacteriano (previa separación a partir de

los extractos crudos de nódulos), y posterior electroforesis y electrotransferencia a nitrocelulosa, observamos un enriquecimiento de la banda de 175 kD en extracto soluble control de nódulos (Fig. 31 calle 3) que apenas fue detectada en el pellet de dichos extractos (Fig.31 calle 4), y cuya aparición en el extracto soluble y pellet de nódulos deficientes (Fig.31 calles 5 y 6, respectivamente) fue mucho menor, y apareció fundamentalmente asociada al pellet de los mismos (Fig.31 calle 6). Por otro lado, en la incubación previa con proteína A-sefárosa, que eliminaría las posibles uniones inespecíficas de componentes de la muestra (el denominado control “pre-cleaning”) (Fig.31 calles 7 y 8), se observó intensamente la aparición de la banda de menor movilidad de la AGPE únicamente en extractos control (Fig.31 calle 7) y fue prácticamente imperceptible en extractos deficientes (Fig.31 calle 8). Se ha de tener en cuenta que las muestras, tras el “pre-cleaning”, experimentan una eliminación de parte de la proteína total al centrifugar, y además, la incubación con la resina sefárosa, al igual que ocurre con el Dowex, podría provocar la unión inespecífica de la forma más móvil de la AGPE reduciendo su presencia tanto en las muestras control como deficientes.



**Figura 31.** (A) Inmunodetección de RGII en extractos de nódulos control (1) y deficientes de B (2). (B) Ensayos de inmunoprecipitación de MAC265 y posterior inmunodetección con MAC265 en el extracto soluble de nódulos control (3) y deficientes de B (5) y en el pellet del extracto control (4) y deficiente (6). Las calles 7 y 8 corresponden al control “pre-cleaning” que minimiza las interacciones inespecíficas con la proteína A-sefárosa gracias a la incubación preliminar con la misma, tanto en extractos control (7) como deficientes (8). Así mismo, las calles 10 y 11, corresponden a extractos de raíz inmunoprecipitados e inmunodetectados posteriormente con MAC265, en donde no aparece la señal de 95 kDa característica de raíz. (C) Por último aparecen los ensayos de inmunoprecipitación con anti-RGII control (“pre-cleaning”) y posterior marcaje con MAC265 en extractos control (12) y deficientes (13). Como se puede observar, la coincidencia en tamaño que llevó a pensar en la posible asociación entre la pectina RGII y MAC265 viene avalada por la aparición de marcaje en la inmunodetección con MAC265 en extractos de nódulos inmunoprecipitados con anti-RGII.

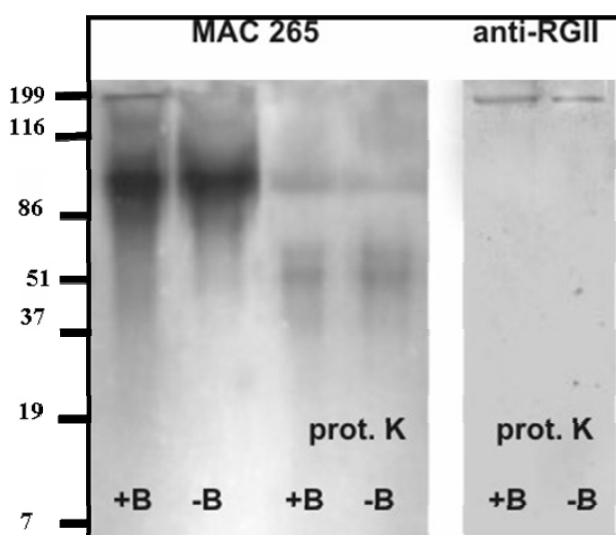
Recíprocamente, la inmunoprecipitación de extractos de nódulos con anti-RGII y posterior detección de dicha pectina con este antisuero, también dio lugar a la aparición



de una banda reconocida por anti-RGII de movilidad coincidente con la banda de 175 kD reconocida por MAC265, tanto para las muestras control (Fig.31 calle 1) como deficientes (Fig.31 calle 2). Por último, MAC265 reaccionó con esta misma banda en material procedente de extractos de nódulos previamente inmunoprecipitados con anti-RGII (Fig.31 calles 12 (control) y 13 (deficientes en boro)) lo que dilucidaba su posible interacción.

Apoyado por la inexistencia de marcaje de la banda de alto peso molecular de la AGPE en raíz (Fig.31 calles 10 y 11), estos resultados podrían indicar que la banda de menor movilidad correspondiese a un componente glucídico específico de nódulos que reaccionase tanto con MAC 265 como con RGII, al menos en nódulos desarrollados en presencia de B, o bien que esta banda de menor movilidad en nódulos control resulte de una asociación entre AGPE y la pectina RGII, en cuyo caso, dicha asociación y su presencia en la fracción soluble o unida a la superficie bacteriana, estaría condicionada por la presencia de B durante el desarrollo de los nódulos.

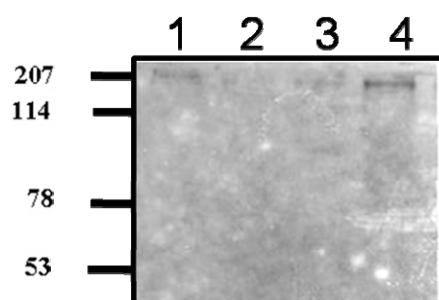
El tratamiento con proteinasa K de los extractos de nódulos y posterior incubación con ambos anticuerpos, demostró que desaparece casi en su totalidad el marcaje de MAC265, permaneciendo el de anti-RGII (Fig.32), indicando que el antígeno glucídico reconocido por MAC265 en dicha banda está asociado a una parte proteica.



**Figura 32.** Marcaje con MAC265 y anti-RGII en extractos solubles de nódulos control y deficientes en B tratados con proteinasa K (calles prot. K), mostrando que la señal de MAC 265 está asociada a una proteína, puesto que desaparece con el tratamiento de la proteasa.

Tratando de establecer una posible intervención del B en la interacción AGPE-RGII, analizamos también la capacidad de asociación con Amberlita del RGII procedente de

extractos de nódulos +B o -B (Fig.33). En extractos de nódulos deficientes en B la mayor parte del RGII quedó libre de la Amberlita (calle 4). Asumiendo que la Amberlita liga bórico/borato, en deficiencia de B el RGII no tendría capacidad de asociarse a dicha resina (como indica la débil señal de la calle 2). Por su parte, en extractos de nódulos control, parte del RGII queda ligado a la Amberlita (calle 1) y parte libre (calle 3).



**Figura 33.** Extractos solubles de nódulos incubados con Amberlita y marcados con anti-RGII tras electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y electrotransferencia a nitrocelulosa. Calle 1: Fracción de nódulo control (+B) asociada a Amberlita. Calle 2: Fracción de nódulo -B asociada a Amberlita donde no aparece señal. Calle 3: Fracción de nódulo control (+B) no asociada a Amberlita (sobrenadante). Calle 4: Fracción de nódulo -B asociada a Amberlita (sobrenadante)

Probablemente el borato estaría mediando la interacción RGII-AGPE responsable de la aparición de la banda de 175 kDa detectada por MAC265, que no se asocia a Amberlita (Fig.29) y posiblemente, parte de la forma de RGII no asociada a Amberlita sería la que se encontraría asociación con AGPE. Este tipo de interacción supondría que los cuatro sitios de enlace del borato estuvieran ocupados, lo que impediría su interacción con la resina, justificando así los resultados observados.

Para tratar de confirmar que la aparición de esta banda de 175 kDa resultante de la asociación RGII-AGPE y su localización en la fracción soluble de los nódulos se debía a la presencia de B, se incubaron *in vitro* homogenados de nódulos con una solución tamponada de borato (bórax 50 mM), que previene la unión *in vitro* de AGPE a la superficie de bacterias y bacteroides (Bolaños y col., 1996). De hecho, dicha unión podría ser responsable de que los rizobios quedasen “atrapados” en el canal de infección impidiendo la invasión de acuerdo a los ensayos *in vitro* realizados en el trabajo de Bolaños y col., 1996. De este modo, y tras su centrifugación y lavado, se inmunoprecipitó con MAC265 y se inmunodetectó con el mismo anticuerpo en la fracción soluble (sobrenadantes de extractos) o asociada a la fracción bacteriana (*pellet* del extracto) con MAC265.

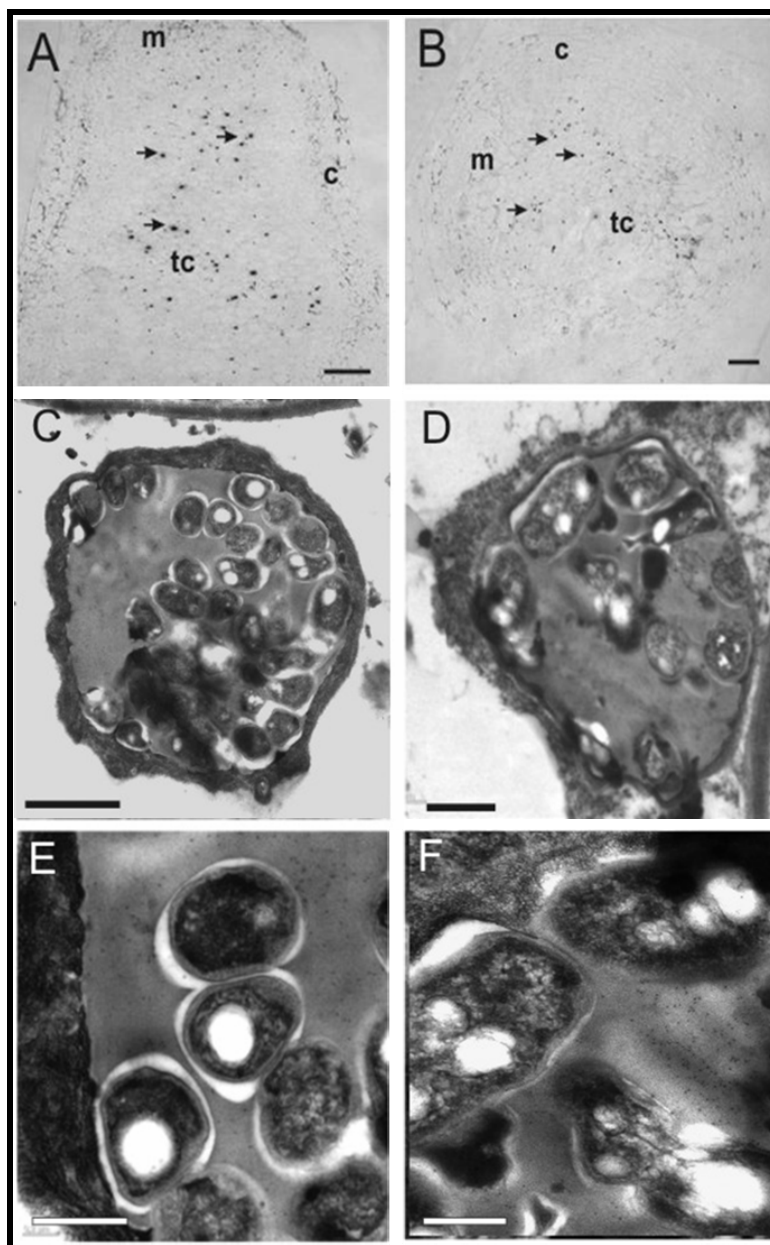


**Figura 34.** Inmunoprecipitación con MAC265 sobre extractos resultantes del tratamiento con borato tanto de nódulos control como deficientes en B. Los homogenados de nódulos se incubaron con bórax 50 mM durante 1 h a 4°C. Posteriormente se separó la fracción soluble (S) y el pellet (P) y se efectuó la IMP. Las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida SDS-(PAGE) y se transfirieron a nitrocelulosa para la detección inmunológica de AGPE con MAC265. Calle 1: sobrenadante de nódulos control; Calle 2: Pellet de nódulos control; Calle 3: Sobrenadante de nódulos control tratados con bórax 50 mM; Calle 4: Pellet de nódulos control tratados con bórax 50 mM; Calle 5: Sobrenadante de nódulos deficientes; Calle 6: Pellet de nódulos deficientes; Calle 7: Sobrenadante de nódulos deficientes tratados con bórax 50 mM; Calle 8: Pellet de nódulos deficientes tratados con bórax 50 mM.

Como se observa en la figura 34, la banda de 175 kD detectada por MAC265 resultante de la asociación AGPE-RGII permaneció en la fracción soluble de extractos de nódulos control tras el tratamiento con bórax (Fig.34 calles 1 y 3 respectivamente), mientras que la banda de baja movilidad asociada al pellet bacteriano en dichos nódulos (Fig.34 calles 2 y 4) parecía reducirse en concordancia con la idea de la pérdida de la asociación de la AGPE a la bacteria mediada por B. En extractos de nódulos deficientes en B no aparecía la banda de AGPE de baja movilidad en el sobrenadante de los extractos (Fig.34 calle 5) apareciendo señal en su pellet (Fig.34 calle 6), tal y como se había descrito (Fig.34 calle 6). Tras el tratamiento con bórax de extractos deficientes en B, se observó la aparición de una banda tenue de 175 kDa en la fracción soluble (Fig.34 calle 7) con una reducción de la glicoproteína asociada al pellet tratado con bórax (Fig.34 calle 8). Aunque no de manera intensa se produce un cambio en el bandeo producido por el tratamiento con bórax, que confirmaría que el B está implicado en la interacción AGPE-RGII responsable de esta banda, pues tanto en extractos control como en deficientes de B, tras la incubación con bórax, se redujo aparentemente la cantidad de AGPE asociada al pellet bacteriano, como ya se había publicado previamente (Bolaños y col., 1996).

Para comprobar si estas interacciones mediadas por B tendrían un reflejo en el desarrollo de canales de infección, se realizaron estudios de inmunohistoquímica y de inmunocitoquímica de localización de AGPE con MAC265 sobre cortes semifinos y

ultrafinos, respectivamente, de nódulos control y deficientes en B. La figura 35 muestra que MAC265 se secreta a canales de nódulos tanto control (+B) (Fig.35 A, C, E) como -B (Fig.35 B, D, F), sin embargo, se puede observar que apenas existen canales en el tejido central de nódulos -B, que aparentemente abortan su desarrollo en las células más alejadas de la raíz (las más jóvenes) (Fig.35 B flechas), lo que explicaría que el tejido central de los nódulos deficientes en B aparezca prácticamente sin invadir.

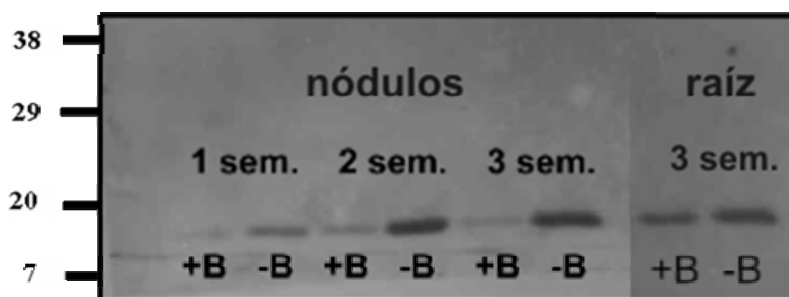


**Figura 35.** Inmunodetección de MAC265 en cortes de nódulos de guisante (*Pisum sativum*) 3 semanas post-inoculación control (A, C y E) y deficientes en B (B, D y F). (A-B) Cortes semifinos en los que aparecen marcados con MAC265 canales y gotas de infección (señalados con flechas). (C-F) Inmunocitoquímica con MAC265 en canales de infección control (C y E) y deficientes de B (D y F), en donde se observa marcaje en la matriz que rodea a las bacterias, matriz que en condiciones control no mantiene contacto con las bacterias (C y E) algo que sí ocurre en condiciones de deficiencia (D y F). (m) meristemo del nódulo; (tc) tejido central; (C) Córtex del nódulo. Barras de escala: 0,1 mm (A y B), 1  $\mu$ m (B y C) y 0,2  $\mu$ m (D y E).

El estudio inmunocitoquímico y posterior observación al microscopio electrónico de canales de infección, mostró que los canales –B (Fig.35 D, F) contenían menos bacterias en su interior que los canales control (Fig. 35 C, E). Además, muchas de las bacterias en canales de nódulos -B parecían lisadas. En cuanto a la detección de AGPE, en nódulos control apareció un espacio de separación entre el material electrodense de matriz marcado por MAC265 y la superficie de la mayoría de las bacterias en el interior del canal, mientras que en canales de nódulos –B, la ausencia de un halo limpio de matriz junto con el marcaje con oro indicaban que la glicoproteína AGPE estaba físicamente asociada a la superficie de la mayoría de las bacterias. Estos resultados avalan el hecho de que en deficiencia de B la interacción de AGPE con la superficie bacteriana impida la proliferación del rizobio resultando finalmente en el aborto de la infección.

#### **4.2. Inducción de proteínas relacionadas con patogénesis**

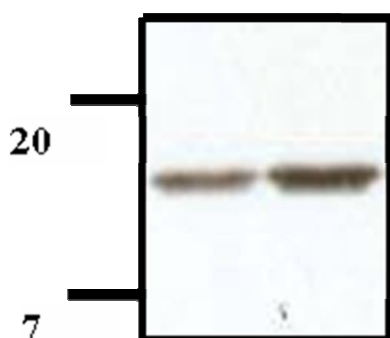
Además de la interacción de AGPE con *Rhizobium*, que puede significar una barrera física contra la infección en deficiencia de B, como hemos descrito anteriormente, la aparición de proteínas relacionadas con patogénesis, tanto en leguminosas con nódulos de desarrollo indeterminado (guisante) como determinado (judía) (Fig.24 a la 28), podría ser indicativo de una respuesta de defensa por parte de la planta en nódulos deficientes en B. Los siguientes ensayos, centrados en ABR17 de guisante, fueron destinados a la caracterización de la inducción de esta proteína, para determinar si era un efecto de la deficiencia de B que, por tanto, ocurriría en otros tejidos, o bien era específico de nódulos, probablemente derivado de un reconocimiento anómalo del rizobio por la planta deficiente en B que provocaba la aparición de respuestas clásicas de defensa frente a patógenos, lo que llevaría a plantear la implicación del B en la naturaleza del reconocimiento planta-bacteria.



**Figura 36.** Evolución temporal de ABR17 durante el desarrollo de nódulos control (+B) y deficientes en B (-B), o en raíces de plantas infectadas de tres semanas. Los extractos de nódulos o de raíz se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a nitrocelulosa para la detección inmunológica con anti-ABR17. (Todas las muestras se diluyeron 1:100 partiendo de carga proteica total inicial de 9  $\mu$ g)

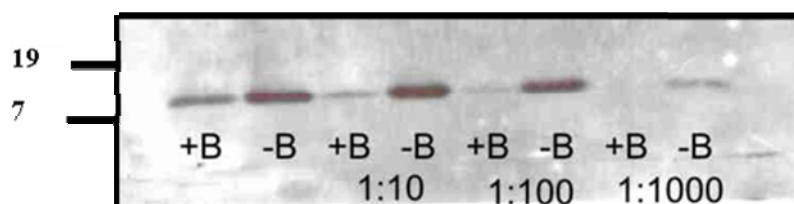
Como se puede observar en un ensayo de inmunodetección de ABR17 en extractos de nódulos a lo largo del tiempo (Fig.36), durante el desarrollo de nódulos deficientes en B la señal de anti-ABR17 ya fue fuerte tras una semana de desarrollo, comparada con la existente en extractos de nódulos control y experimentó un gran aumento de intensidad durante las semanas 2 y 3. Así mismo, durante este tiempo de desarrollo también se detectó un aumento de ABR17 en nódulos control que resultó despreciable respecto a la gran inducción en nódulos deficientes en B.

Puesto que ABR17 se sintetiza de forma constitutiva en raíces de guisante (Biesiadka y col., 2002; Mylona y col., 1994), realizamos un ensayo de inmunodetección en extractos de raíces no infectadas de guisante tras tres semanas de desarrollo. Como se puede observar (Fig.37), ABR17 apareció de forma intensa tanto en raíces control como deficientes en B y, aunque había una ligera inducción de dicha proteína en deficiencia de B, comparada con los tratamientos control, ésta fue mucho menor que en nódulos.



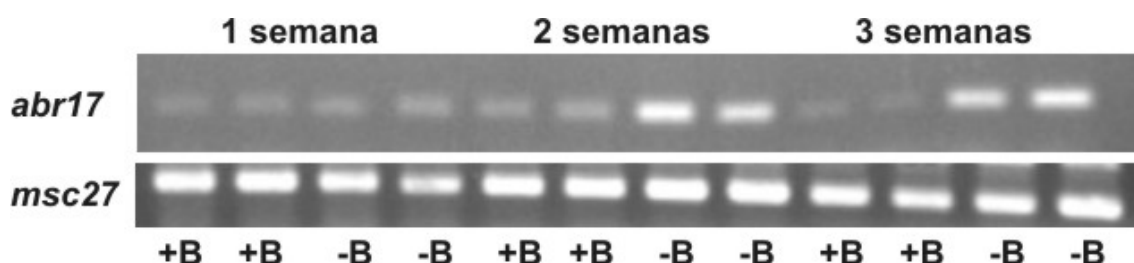
**Figura 37.** Inmunodetección de ABR17 en extractos de raíz no infectada de guisante (*Pisum sativum*) control (A) y deficiente en B (B). La carga proteica total inicial fue de 9  $\mu$ g.

De manera comparativa, la señal de ABR17 en nódulos fue, en todo caso, más intensa que la de raíz. De hecho, y como muestra la figura 38, la dilución 1:1000 de extractos de nódulos deficientes en B aún mostró señal. Además, en las inmunodetecciones de ABR17 de los extractos de nódulos y raíz infectada, siempre se utilizó la dilución 1:100 para evitar la saturación de la señal de dicho anticuerpo, mientras que para extractos de raíz no infectada se utilizó la muestra concentrada.



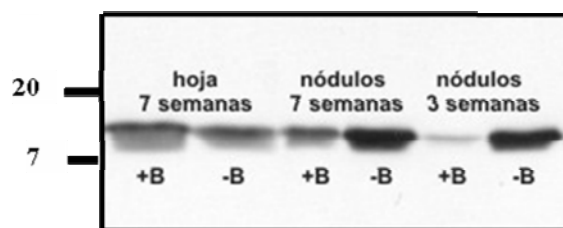
**Figura 38.** Inmunodetección de ABR17 en extractos de nódulos control (calles 1, 3, 5 y 7) y deficientes en B (calles 2, 4, 6 y 8), de diluciones seriadas 1:10 a partir de las muestras concentradas con una carga proteica total de 9 µg/µl (calles 1 y 2).

El estudio por RT-PCR de la expresión del gen que codifica para ABR17 sugirió que el efecto inductor en nódulos deficientes en B existía también a nivel transcripcional, pues la expresión relativa del gen *abr17* fue mucho mayor, especialmente a partir de las dos semanas en nódulos deficientes en B (Fig.39).



**Figura 39.** RT-PCR mostrando la evolución temporal de la actividad relativa del gen *abr17* durante el desarrollo de nódulos control (+B) y deficientes en B (-B). Como control se determinó la expresión del gen constitutivo *msc27*.

Puesto que se ha descrito la inducción de estas proteínas también en tejidos senescentes de hoja y nódulo (Lers y col., 1998; Hanfrey y col. 1996, Sikorsi y col., 1999), realizamos ensayos de inmunodetección de ABR17 en extractos de distintos órganos de plantas noduladas de guisante cuando estos manifestaban efectos claros de senescencia (Fig.40).



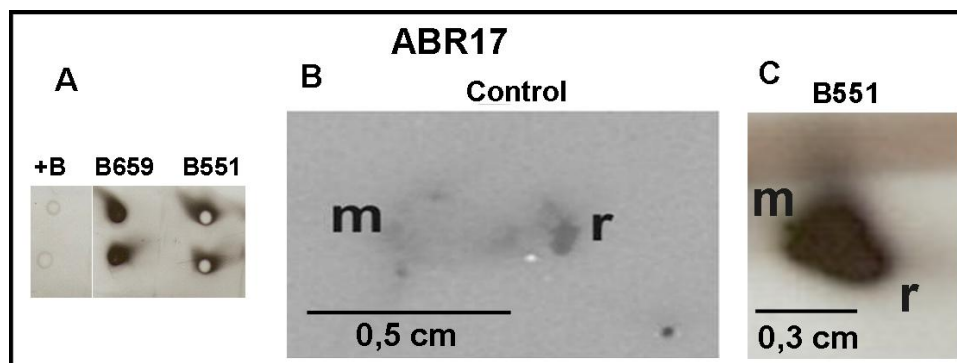
**Figura 40.** Inducción de ABR17 en tejidos senescentes (7 semanas post-inoculación) de hoja y extractos diluidos 1:100 de nódulos de plantas de guisante control (+B) y deficientes en B (-B). Para comparar la cantidad de antígeno con la de nódulos maduros, se añadieron extractos de nódulos de 3 semanas (diluidos 1:100). Las muestras proteicas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a nitrocelulosa para la detección inmunológica con anti-ABR17. Las muestras concentradas de partida poseían una carga proteica total de 9 µg.

ABR17 se indujo en hojas senescentes, pero en un nivel similar tanto en tratamientos +B como -B, y también aumentó la señal de anti-ABR17 en nódulos control de 7 semanas (en estado de senescencia muy avanzado), respecto a lo descrito para nódulos de 3 semanas. Sin embargo, la inducción de la proteína en estos nódulos fue aún mucho menor que en nódulos deficientes en B, en los que ya era igual de elevada tras 3 semanas de desarrollo.

En conjunto, estos resultados sugerían una posible reacción de defensa de la planta en deficiencia de B, posiblemente por un fallo en el reconocimiento del *Rhizobium*, que sería percibido como un patógeno por la leguminosa. Para tratar de confirmar que este tipo de reacciones de defensa ocurren por alteración del reconocimiento planta-bacteria, realizamos un ensayo de detección de ABR17 en “inmunodots” de extractos de pseudonódulos inducidos por mutantes en polisacáridos superficiales, tanto LPS como EPS, implicados en el mecanismo de infección (Fig.41). Como se puede observar, tanto tras la inoculación de guisante con *R. leguminosarum* B659 (mutante sin antígeno O, por una alteración en el core del LPS, Perotto S. y col., 1994), como especialmente con *R. leguminosarum* B551 (mutante defectuoso en la síntesis de exopolisacárido, Borthakur y col. 1986), se produjo una inducción de ABR17. Puesto que ambos mutantes son incapaces de infectar e invadir nódulos de guisante, los resultados obtenidos en deficiencia de B podrían relacionarse con un mecanismo de defensa contra la infección por fallo en las interacciones de reconocimiento planta-bacteria que llevaría a la inhibición de la invasión de nódulos deficientes en B. Paralelamente, se realizó un ensayo de “tissue-print” (Fig.41 B y C) de nódulos control (Fig.41 B) y pseudonódulos inducidos por el mutante B551 (Fig.41 C), que indicó que la inducción de ABR17 era

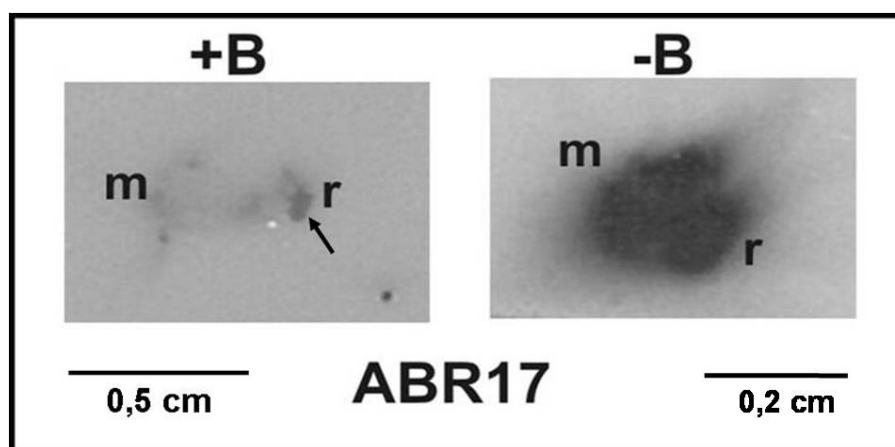


generalizada en todo el tejido de los pseudonódulos inducidos por el mutante, mientras que la detección de la proteína fue muy débil en nódulos control, excepto en la zona de unión a la raíz.



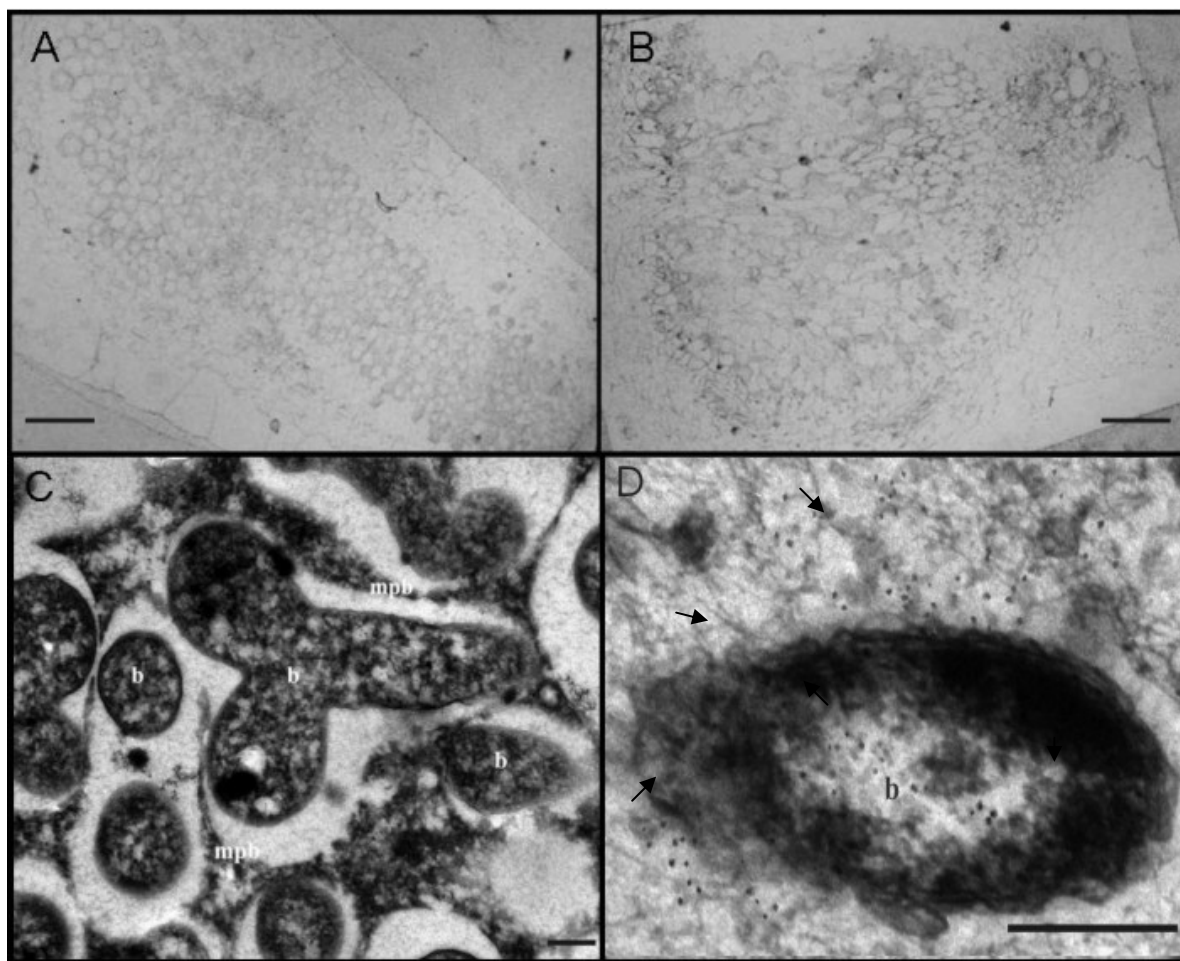
**Figura 41.** (A) Resultado de “immunodots” con ABR17 de extractos de nódulos de 3 semanas postinoculación, donde se observa señal de ABR17 en los pseudonódulos de guisante inoculados con los mutantes B551 y B659 respecto a la inexistencia de señal en extractos control. (B) El resultado del Tissue Print en nódulos control revela la aparición de señal en la zona de unión a la raíz, mientras que en nódulos de B551, la señal se extiende a toda la superficie del nódulo.

Por último, realizamos experimentos de inmunolocalización de ABR17 por Tissue Print en cortes de nódulos de guisante. Al igual que ocurría con los pseudonódulos inducidos por el mutante B551 (Fig.41), la figura 42 muestra la inducción de ABR17 extendida por todo el tejido del nódulo deficiente en B (Fig. 42, -B), respecto a la señal en nódulos control, que quedó restringida a la zona de unión a la raíz (Fig. 42, control, +B, señalado con flecha).



**Figura 42.** Inmunolocalización de ABR17 en “tissue-prints” de cortes frescos de nódulos control (+B) y deficientes en B (-B) 3 semanas post-inoculación. (m) meristemo del nódulo; (r) raíz.

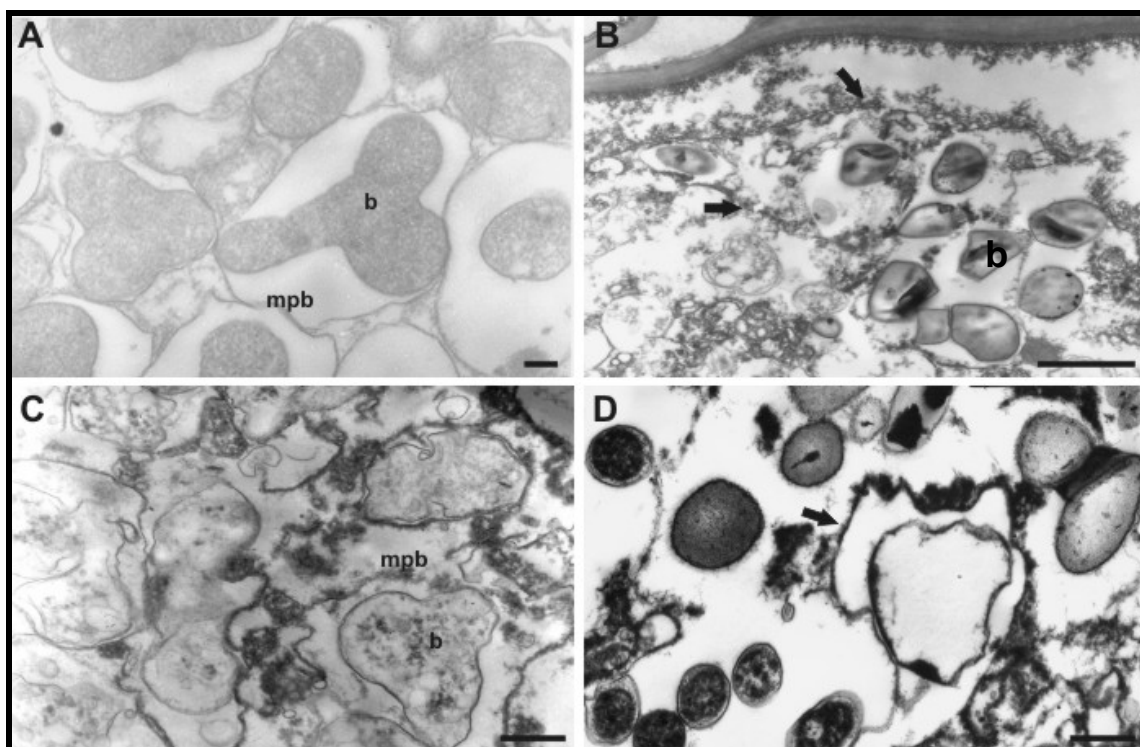
El estudio inmunohistoquímico e inmunocitoquímico (Fig.43) nos permitió observar que ABR17 se localizaba en el citosol de las células infectadas (Fig.43 D) y en la periferia de las mismas en nódulos –B (Fig.43 B), mientras que, siendo débil la señal del anticuerpo en nódulos control, ésta era ligeramente más fuerte en las células infectadas (Fig.43 A).



**Figura 43.** Estudio inmunohistoquímico e inmunocitoquímico de ABR17 sobre cortes semifinos y ultrafinos de nódulos de 3 semanas post-inoculación, control (A y C) y deficientes en B (B y D). Las figuras A y B muestran el estudio inmunohistoquímico donde aparece, en cortes control (A), una señal débil generalizada ligeramente más fuerte en las células infectadas cercanas a la raíz. Por el contrario, en los cortes de nódulos deficientes en B (B) se muestra una señal intensa en la periferia interna de las células infectadas y algo más débil en el citosol. Por otro lado, el estudio inmunocitoquímico de ABR17 (C y D) muestra la inexistencia de señal alrededor de simbiosomas control (C) mientras que en el corte deficiente (D) aparece señal alrededor de las bacterias e incluso en su interior (señaladas con flechas). (mpb) membrana peribacterioidea; (b) bacteroides; Barras de escala: 01 mm (A y B); 0.5  $\mu$ m (C y D).

## 5. Alteración de los mecanismos de control de la difusión de oxígeno

Como se describió al inicio de este estudio (Tabla 16 y Fig.17 y 18), los nódulos deficientes en B degeneran prematuramente. Un estudio por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de nódulos control y deficientes en B (Fig.44) confirmó la aparición de procesos aparentemente relacionados con muerte celular en estos últimos. Bajo condiciones de deficiencia de B, se observó una alteración en el sistema de endomembranas que se tradujo en una pérdida de estructura de la membrana plasmática y peribacteroidea, procesos tempranos que como describen trabajos previos (Pladys y Rigaud, 1985; Puppo y col., 1991), son indicadores de senescencia en nódulo, y en todo caso, significan la pérdida de funcionalidad del órgano por la ruptura en el proceso de señalización y de traspaso de metabolitos entre los simbios.



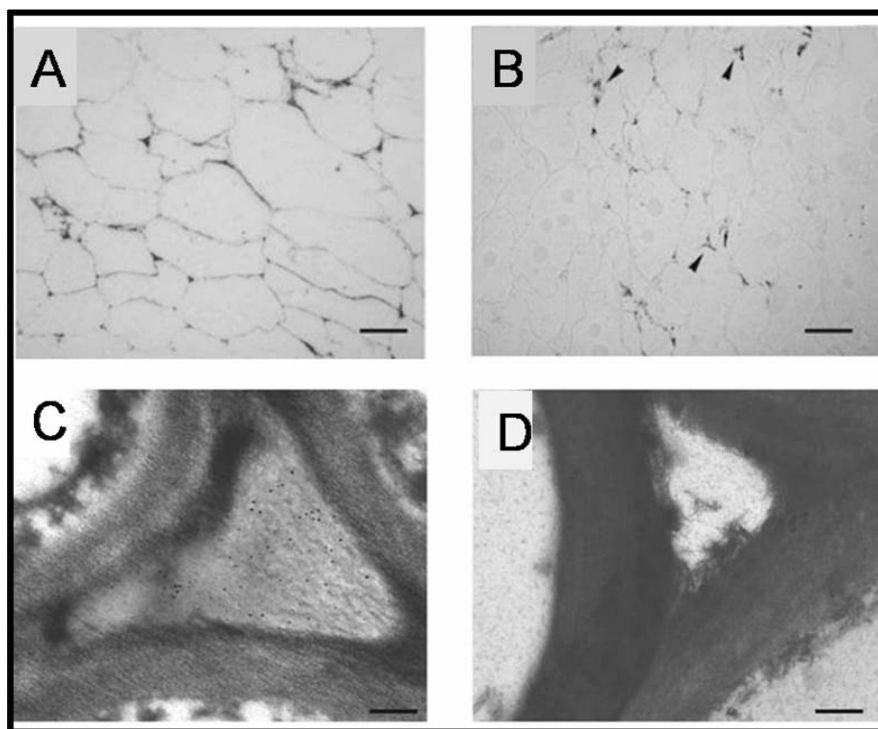
**Figura 44.** Cortes ultrafinos para el estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de nódulos 3 semanas post-inoculación. (A) En la imagen correspondiente a nódulos control se observan simbiosomas (b) con su correspondiente membrana peribacteroidea definida (mpb), (B-D) por el contrario, en los cortes correspondientes a nódulos deficientes de B, observamos la desestructura celular y de membranas (flechas) incluida la mpb, así como la degradación de los bacteroides. Barras de escala 0.5  $\mu\text{m}$ .

Los efectos previamente descritos de la deficiencia de B sobre la inhibición de la infección y la posible inducción de una reacción de defensa, explicarían esta muerte celular por un proceso de senescencia prematura o/y de respuesta hipersensible similar al que desencadena la planta en condiciones normales como mecanismo de autocontrol de la nodulación (Vasse y col., 1993). Pero, además de estas alteraciones, la relación descrita entre el B, el ramnogalacturonano II (RGII) y la AGPE, cuya secreción se produce tanto a los canales de infección como a los espacios intercelulares del córtex, asegura el cierre de la barrera de difusión. También la ausencia del transportador de oxígeno (leghemoglobina), que regula la cantidad de oxígeno que llega a los bacteroides, en nódulos deficientes en B, podría resultar en un fallo en estos mecanismos de regulación del oxígeno, y un posterior daño oxidativo que también conduciría a la muerte celular observada.

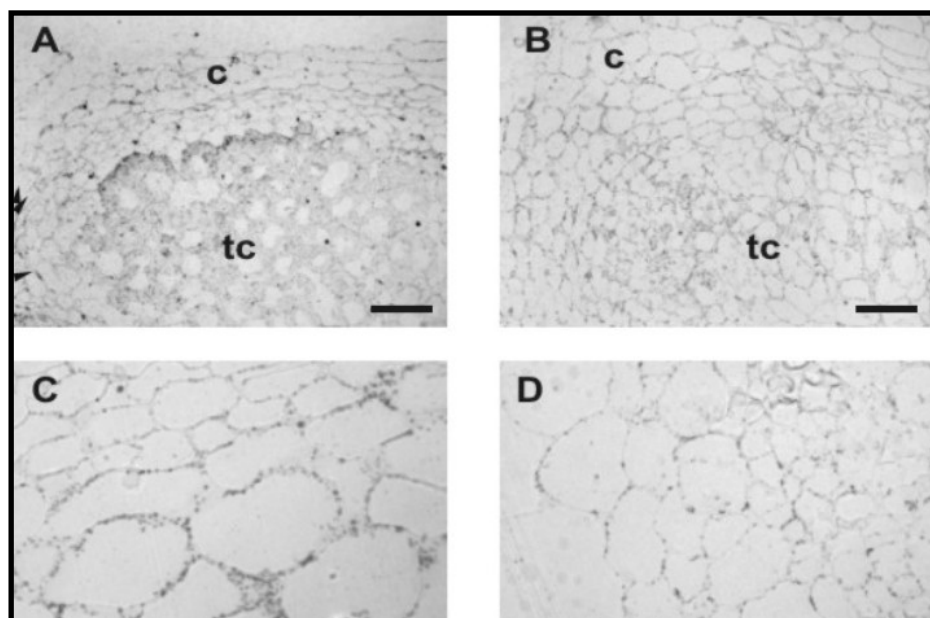
### **5.1. Localización de polisacáridos y glicoproteínas asociados a Amberlita implicados en el funcionamiento de la barrera de difusión de oxígeno**

Los efectos antes descritos del B sobre las propiedades estructurales y la interacción entre AGPE y RGII podrían tener también su repercusión sobre la estructura de la barrera de difusión de oxígeno. Se realizaron por tanto estudios inmunohistológicos o inmunocitoquímicos con MAC265 y anti-RGII a nivel del córtex de nódulos control y deficientes de B para visualizar estos componentes en la barrera de difusión de oxígeno.

Como se observa en la figura 45, MAC265, además de aparecer en los canales de infección previamente descritos marca, en nódulos control, las paredes celulares y los espacios intercelulares, que aparecen aparentemente sellados por AGPE (Fig.45 A, C), por el contrario, las paredes celulares de nódulos deficientes (-B) apenas muestran marcaje con MAC265, quedando éste reducido a algunos espacios intercelulares que, mayoritariamente, aparecen abiertos (Fig.45 B puntas de flecha, 45 F), lo cual podría suponer una vía de entrada masiva de oxígeno al nódulo.



**Figura 45.** Inmunohistoquímica con MAC265 en el córtex del nódulo (A y B) y marcaje con oro coloidal de MAC265 en espacios intercelulares del córtex del nódulo en cortes ultrafinos (C y D). En B, se observa que el marcaje está restringido a algunos espacios intercelulares (marcados con puntas de flecha) y no rellena dichas zonas (D). Esto no ocurre en A donde se observa marcaje de MAC265 en la totalidad de espacios intercelulares del córtex de nódulos control. La barra de escala indica 0,1 mm para los cortes A-B y 0,1  $\mu$ m para C-D.

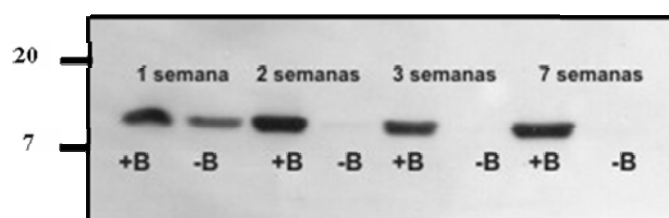


**Figura 46.** Inmunolocalización de RGII en cortes semifinos de nódulos de guisante control (A, C) y deficientes en B (B, D) 3 semanas post-inoculación. Además de las paredes celulares, anti-RGII marca algunas células infectadas en nódulos control (tc en A), pero no en nódulos deficientes en B (B). El marcaje de anti-RGII a nivel de paredes celulares del córtex es aparentemente más intenso en nódulos control (C) que en deficientes en B (D). (tc) tejidos centrales; (c) córtex. Barra de escala: 0.5 mm (A-B), 0.1 mm (C-D).

El marcaje de los nódulos con anti-RGII (Fig.46) parece indicar que las paredes de células de nódulos –B (Fig.43 B, D) presentan aparentemente una menor riqueza de esta pectina que las de nódulos control (Fig.46 A, C), anomalía estructural que también podría llevar a un mal funcionamiento de la barrera de oxígeno. Además, pudimos observar que los simbiosomas de algunas células infectadas de nódulos control aparecían marcados por anti-RGII (Fig.46 A), algo previamente observado por Redondo-Nieto (2002); pero este fenómeno, que será objeto de estudio en un apartado posterior de esta Tesis, no se observó en nódulos –B (Fig.46 B).

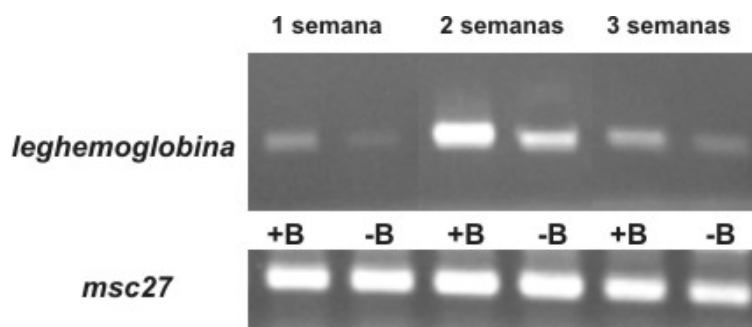
## 5.2. Efecto de la deficiencia de B sobre la estabilidad de la leghemoglobina

Además de la alteración estructural que podría afectar al funcionamiento de la barrera de oxígeno, previamente hemos descrito a la leghemoglobina como una proteína asociada a la fracción ligada a Amberlita (Fig.19), cuya presencia es prácticamente indetectable en nódulos de guisante o judía deficientes en B (Fig.21 y 22) .



**Figura 47.** Evolución temporal de la leghemoglobina durante el desarrollo de nódulos de guisante control (+B) y deficientes en B (-B). Los extractos de nódulos (diluídos 1:100) se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a nitrocelulosa para la detección inmunológica con anti-leghemoglobina 5-10 de *Pisum sativum*. Las muestras concentradas de partida poseían una carga proteica total de 9 µg.

El análisis con anti-leghemoglobina en extractos de nódulos a lo largo del tiempo de desarrollo indicó que ésta desaparecía progresivamente en nódulos deficientes en B (Fig.47). Para comprobar si la desaparición de Lb en nódulos –B era debida a un efecto de la deficiencia de B sobre la síntesis o/y estabilidad de la proteína, o bien sobre la transcripción del gen que codifica para la misma, se realizaron ensayos de RT-PCR.



**Figura 48.** RT-PCR mostrando la evolución temporal de la actividad relativa del gen de la leghemoglobina 5-10 de guisante durante el desarrollo de nódulos control (+B) y deficientes en B (-B). Como control se determinó la expresión del gen constitutivo *msc27*.

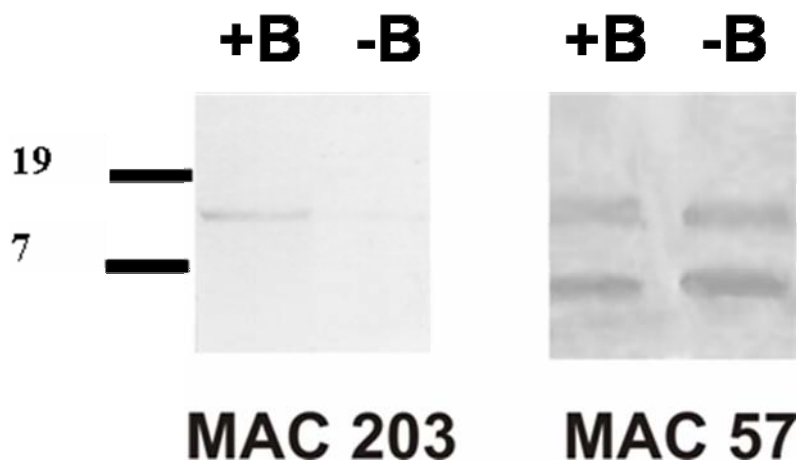
Como muestra la figura 48, la deficiencia de B condujo a una disminución de la expresión del gen de la leghemoglobina, sin embargo, la actividad fue aún lo suficientemente elevada como para no poder explicar la desaparición total de la proteína, sugiriendo que la presencia de B sería necesaria también para la estabilidad de la misma.

### 5.3. Incidencia de la deficiencia de B sobre el daño oxidativo en nódulos

La pérdida de leghemoglobina supondría a su vez una pérdida en la regulación de la difusión del oxígeno hacia los bacteroides, lo que, junto con el posible mal funcionamiento de la barrera de oxígeno debido a la alteración estructural de sus componentes, podría conducir a un exceso de oxígeno en el nódulo.

Para comprobar si existía microaerobiosis en nódulos deficientes en B, se procedió a la inmunodetección del epítipo reconocido por el anticuerpo MAC203 en fracciones de bacteroides procedentes de nódulos control y -B. Este anticuerpo reconoce un epítipo en el antígeno O del de LPS de *R. leguminosarum* 3841 que aparece en bacterias en vida libre crecidas en microaerobiosis y/o pH muy ácido (Kannenberg y Brewin, 1989), así como en bacteroides maduros del tejido central del nódulo con baja presión parcial de O<sub>2</sub> (Kannenberg y col., 1994), por lo que se utilizó como una forma indirecta de

determinar microaerobiosis en los nódulos. La figura 49 indica que en los bacteroides de nódulos deficientes en B la tinción con MAC203 fue prácticamente indetectable.

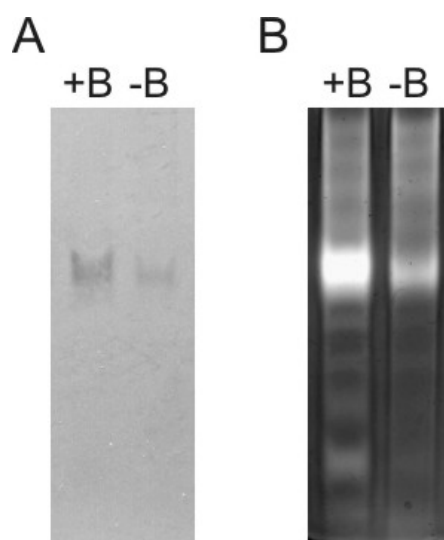


**Figura 49.** Inmunodetección de MAC203 y MAC57 sobre extractos de nódulos control (+B) y deficientes en B (- B). Se observa que, en extractos de nódulos deficientes en B, la señal de MAC203 desaparece, indicando la desaparición de las condiciones de microaerobiosis bajo la deficiencia de dicho micronutriente. MAC57, que reconoce al epítipo constitutivo de *R. leguminosarum* 3841 fue utilizado como control de carga. Las muestras concentradas de partida poseían una carga proteica total de 4,5 µg.

Este resultado sugiere un elevado nivel de oxígeno en el interior del nódulo -B que, además de inhibir a la nitrogenasa, podría llevar a un estrés oxidativo por generación de radicales de oxígeno que fuese también responsable de la degeneración prematura de los nódulos deficientes en B.

Para analizar esta posibilidad, estudiamos la actividad ascorbato peroxidasa (APX), principal responsable de la defensa contra especies activas de oxígeno en nódulos (Becana y Klucas, 1990; Puppo y col., 1981) (Fig.50). La identificación inmunológica mediante un suero anti-APX citosólica en extractos de nódulos separados en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (Fig.50 A) mostró una mayor intensidad de la señal correspondiente a las muestras de nódulos control que a los deficientes en boro, indicando una menor cantidad de proteína APX citosólica en deficiencia del micronutriente.





**Figura 50.** (A) Inmunodetección de APX citosólica en extractos de nódulos de guisante control (+B) y deficientes en B (-B) 3 semanas post-inoculación, separados en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida y electrotransferidos a nitrocelulosa. (B) Ensayo *in gel* de actividad APX de los extractos de nódulos descritos.

Paralelamente, se realizaron ensayos de actividad APX en gel (Fig.50 B) y se observó una menor actividad de todas las isoformas detectadas en extractos de nódulos -B, lo cual podía deberse a la menor cantidad de proteína APX hallada en dichas muestras.

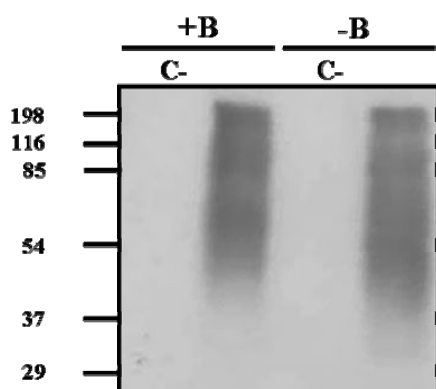
Se analizó primeramente la actividad APX frente a otros mecanismos de protección contra el estrés oxidativo por ser ésta la mayor responsable en nódulos (Nakano y Asada, 1981; Dalton y col., 1986). En cualquier caso, estos resultados podrían indicar una menor capacidad de defensa de los nódulos deficientes de B contra radicales libres o una menor inducción debido a un menor riesgo de daño oxidativo. Para comprobar si existió daño oxidativo en los mismos, se cuantificaron los peróxidos de lípidos (determinación de malondialdehído).

La tabla 18 indica que la concentración de peróxidos de lípidos es similar en nódulos control y deficientes en B, por lo que, con los estudios realizados no se puede afirmar que la desestabilización en los mecanismos de regulación del oxígeno descrita por falta de B, conduzca a un daño oxidativo a estos nódulos.

Muestras	Peroxidación de lípidos (mmol MDA/g <sub>PF</sub> )
Control	13,3275 ± 0,87
Deficiente en boro	14,4275 ± 1,64

**Tabla 18.** Valoración del daño oxidativo por colorimetría de malondialdehído de nódulos de guisante control y deficientes en B 3 semanas post-inoculación. Con un p-valor > 0,05 los datos no ofrecieron diferencias significativas.

Complementariamente, se llevó a cabo la valoración del daño oxidativo a proteínas (grupos carbonilo), pues la oxidación de lípidos de membrana no descartaba la existencia dicho daño oxidativo.



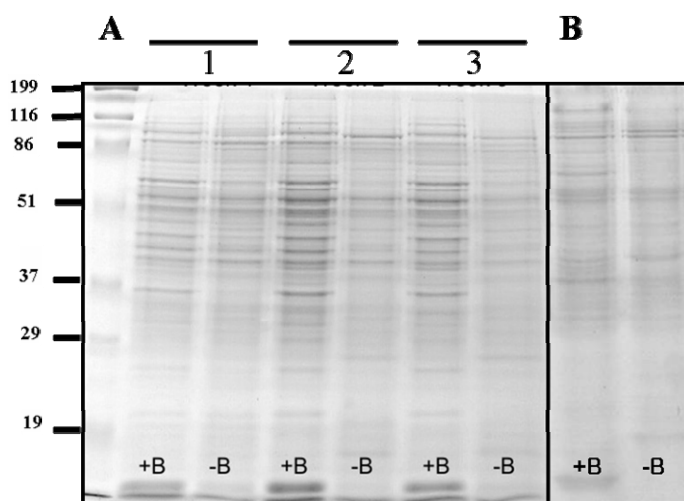
**Figura 51.** Valoración del daño oxidativo a proteínas en muestras control (+B) y deficiente en B (-B). (C-) indica las calles donde se añadieron los controles negativos para ambas muestras (extractos de nódulos sin el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)).

La figura 51 muestra el resultado de la valoración del daño oxidativo a proteínas en muestras control (+B) y deficiente en B (-B), entre las que no aparecieron diferencias apreciables. Por esto, y con las pruebas realizadas, no se pudo determinar que la deficiencia de B condujese a daño oxidativo en los nódulos.

## 6. Efectos del B sobre procesos de diferenciación celular y organogénesis

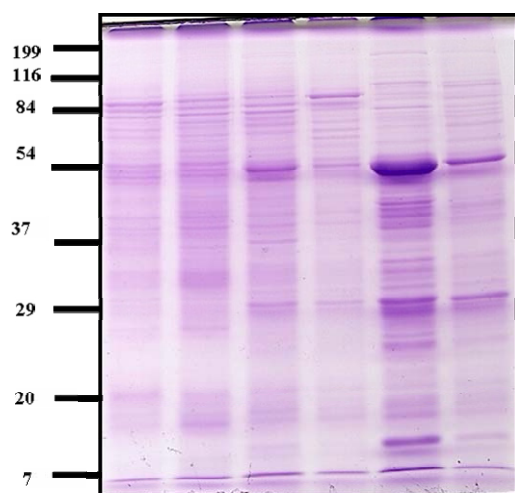
### 6. 1. Efecto de la deficiencia de B sobre la organogénesis vegetal

Como se puede observar en los perfiles electroforéticos de nódulos control y deficientes en B, tanto de guisante (Fig.52 A) como de judía (Fig.52 B), éstos son muy diferentes y las diferencias incluso aumentan a lo largo del desarrollo, lo que sugiere fallos en el proceso de organogénesis del nódulo en deficiencia de B.



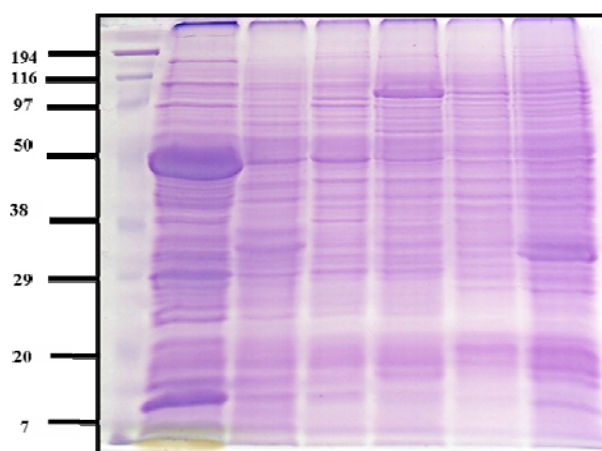
**Figura 52.** Perfiles electroforéticos de nódulos control (+B) y deficientes en B (-B) de (A) guisante (*Pisum sativum*) y (B) judía (*Phaseolus vulgaris*). En A se pueden observar los perfiles proteicos de nódulos de 1 semana (1), 2 semanas (2) y 3 semanas (3), en los que las diferencias en el patrón proteico se van acentuando con el tiempo. En el caso de B, los extractos de nódulos de judía corresponden a 3 semanas post inoculación. La carga proteica total fue de 14 µg.

De hecho, cuando observamos los perfiles proteicos de tejidos diferenciados de plantas control y deficientes en B de 3 semanas post inoculación (hoja, tallo y raíz) (Fig.53) éstos también mostraron diferencias significativas en el bandeo, revelando un posible papel del boro en general sobre el desarrollo de órganos.



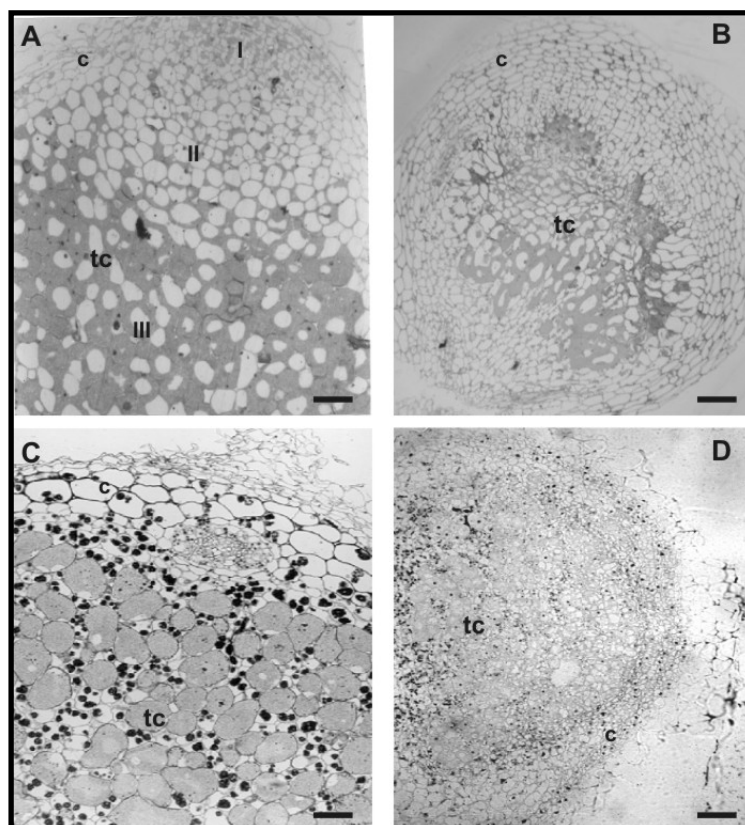
**Figura 53.** Perfil electroforético de tejidos diferenciados de guisante tres semanas post inoculación, de izquierda a derecha, raíz control (calle 1), raíz deficiente en B (calle 2), tallo control (calle 3), tallo deficiente en B (calle 4), hoja control (calle 5) y hoja deficiente en B (calle 6). Se puede observar cómo el patrón proteico entre los tratamientos control y deficiente varía en todos los tejidos desarrollados. La carga proteica total fue de 14 µg.

Para descartar que la diferencia en el patrón proteico se debiera al efecto producido por la deficiencia de nitrógeno en plantas noduladas, se compararon los perfiles proteicos de tejidos diferenciados (hoja, tallo y raíz) (Fig.54) de plantas sin inocular con nitrógeno (añadido al medio) tanto control como deficiente en boro. Las diferencias mayoritarias observadas en la figura 53 también se reprodujeron en el perfil de tejidos crecidos con nitrógeno, lo que permite afirmar que las diferencias se debieron a los efectos de la deficiencia del B en la planta.



**Figura 54.** Perfil electroforético de tejidos diferenciados de plantas de guisante de 3 semanas crecidas con nitrógeno, de izquierda a derecha, hoja control (calle 1), hoja deficiente en B (calle 2), tallo control (calle 3), tallo deficiente en B (calle 4), raíz control (calle 5) y raíz deficiente en B (calle 6). Se puede observar cómo el patrón proteico entre los tratamientos control y deficiente varía en todos los tejidos desarrollados.

El estudio por microscopía óptica de la estructura interna de los nódulos indeterminados de guisante y determinados de judía (Fig.55) confirmó que la deficiencia de B conduce al desarrollo de órganos “cuasi” tumorales, donde no existen claros procesos de diferenciación de células y tejidos, corroborando la importancia del B en estos procesos.

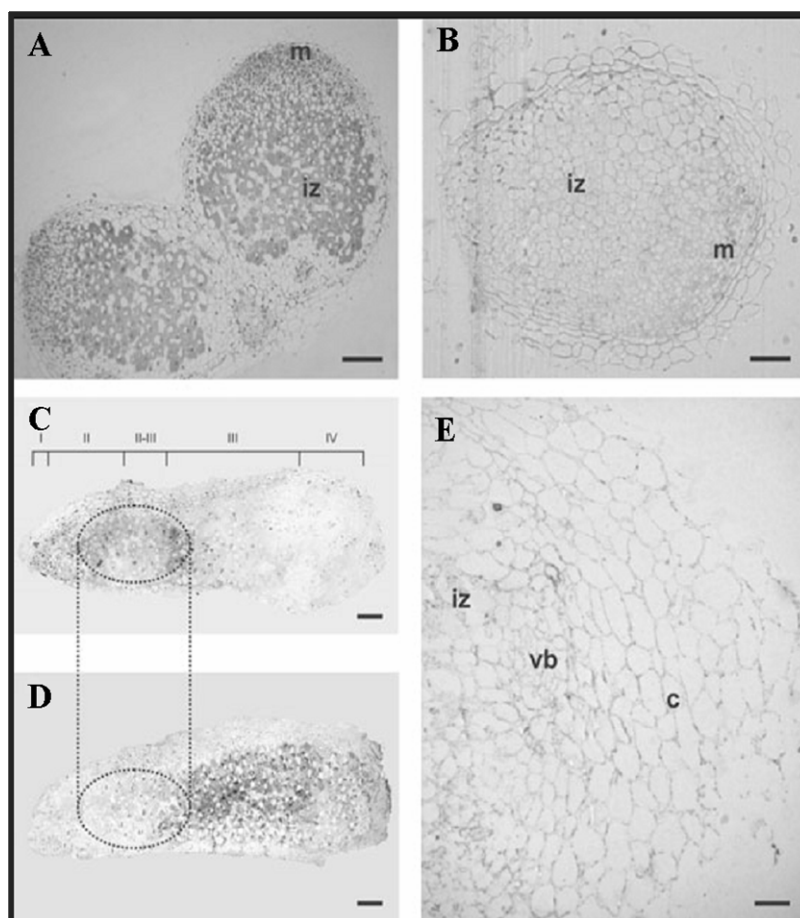


**Figura 55.** Cortes semifinos de nódulos de guisante control (A) y deficiente en B (B) 3 semanas post-inoculación, y de judía control (C) y deficiente en B (D) 2 semanas post-inoculación, mostrando que en deficiencia de B, existe una anormal proliferación celular y no existe una clara diferenciación de tejidos. I: meristemo, II: zona de invasión, III: zona de fijación de  $N_2$ . (c) cortex; (tc) tejidos centrales. Barra de escala 0.1 mm.

## 6.2 Estudio de antígenos reconocidos por anti-RGII asociados a membranas y su relación con el tráfico y fusión de vesículas

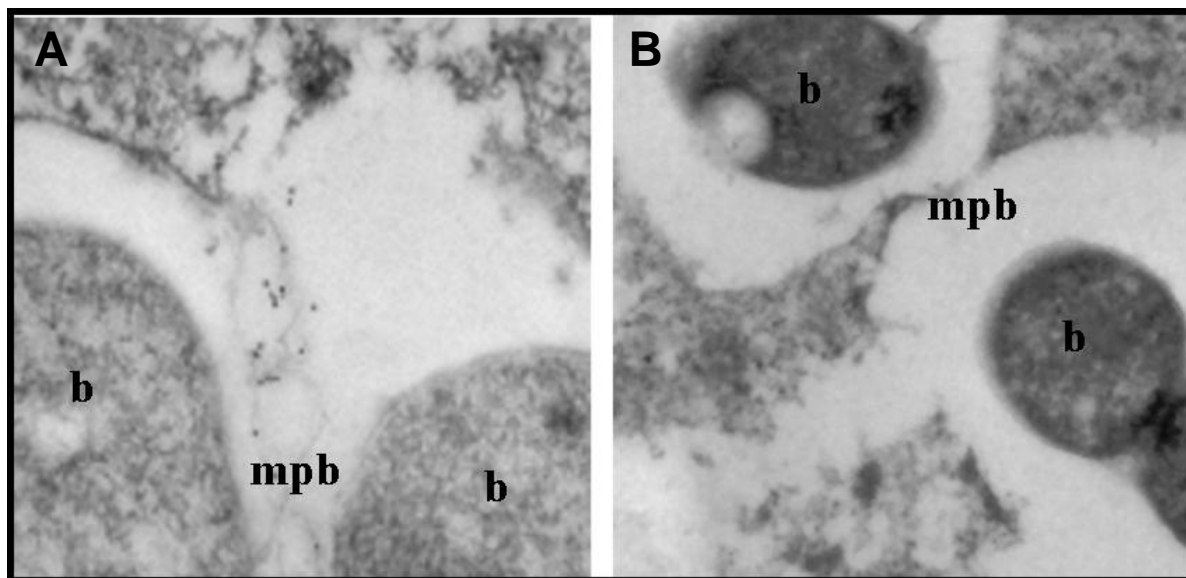
Como se comentó anteriormente, en la figura 46 se observa que anti-RGII marca el interior de las células invadidas en nódulos control pero no en nódulos deficientes en B. El estudio de estos antígenos a lo largo del desarrollo del nódulo (Fig.56) demuestra que aparecen en todas las células infectadas de nódulos de guisante desarrollados en presencia de B, 10 días después de la inoculación (Fig.56 A), mientras que no aparecen en el interior de células de nódulos deficientes en B, en los que el marcaje se limita a la pared celular (Fig.56 B). El estudio en nódulos maduros (nódulos recogidos 21 días tras

la inoculación) indicó que la máxima señal de anti-RGII en nódulos control (Fig.56 C) correspondía a las zonas II e interfase II-III, donde tiene lugar una intensa síntesis de membrana debido a la proliferación de los bacteroides. El marcaje se debilitó en células infectadas correspondientes a las zonas III y IV, correspondientes respectivamente a zonas de fijación de nitrógeno y de senescencia, de acuerdo a lo obtenido con el marcaje con anti-nitrogenasa en un corte seriado (0.5  $\mu$ m más profundo) del mismo nódulo (Fig.56 D). Para el caso de nódulos deficientes en B recogidos 21 días después de inocular (Fig.56 E), el marcaje con anti-RGII quedó también restringido a la zona de pared celular.



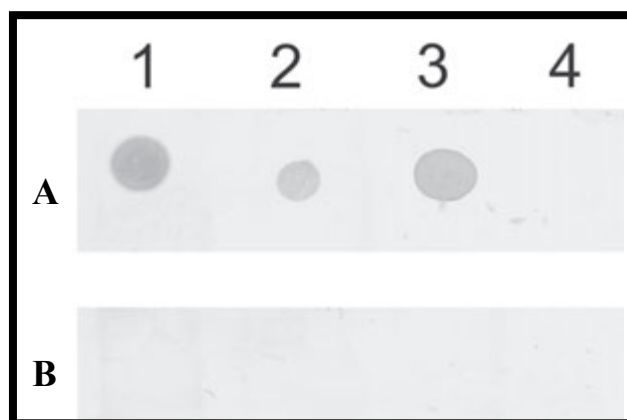
**Figura 56.** Inmunodetección de antígenos reconocidos por anti-RGII en cortes semifinos de nódulos en distintos tiempos de desarrollo. (A) marcaje con anti-RGII en cortes de nódulos control de 1 semana tras la inoculación mostrando señal en zona de pared celular y en todas las células infectadas, (B) marcaje con anti-RGII en cortes de nódulos deficientes en B de 1 semana tras la inoculación, mostrando señal en zona de pared celular pero no en el interior de las células infectadas, (C) marcaje con anti-RGII en cortes de nódulos control de 3 semanas tras la inoculación mostrando una elevada señal en las zonas II y en la interfase entre II y III, llegando a desaparecer en las zonas III y IV, (D) marcaje con anti-nitrogenasa en cortes de nódulos control seriados (0,5 mm de profundidad) respecto al que aparece en (C) de 3 semanas tras la inoculación; y (E) marcaje con anti-RGII en nódulos deficientes en B 3 semanas después de la inoculación, mostrando ausencia de señal en el interior celular. La elipse dibujada en C y en D resalta la zona de mayor intensidad de marcaje con anti-RGII. I, meristemo del nódulo; II, zona de invasión con intensa división de los bacteroides; II-III, zona de interfase de diferenciación de bacteroides; III, zona de fijación de nitrógeno; IV, zona de senescencia; m, meristemo del nódulo, iz, zona de infección; c, córtex del nódulo; vb, tejido vascular. Barra de escala: 0.5 mm (A-D), 0.1 mm (E).

El marcaje con anti-RGII sobre cortes ultrafinos de células infectadas de nódulos de guisante 10 días después de la inoculación (Fig.57), mostró que la señal está asociada a la membrana peribacterioidea (mpb) y que no aparece en simbiosomas deficientes en B.



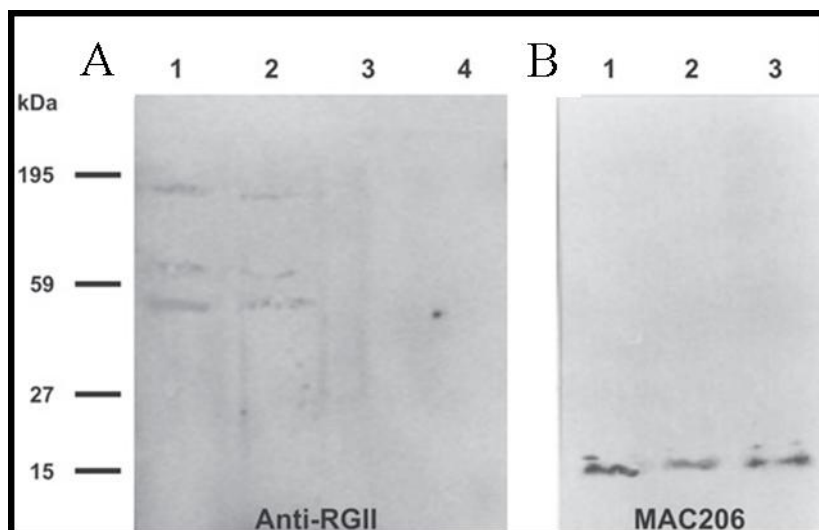
**Figura 57.** Inmunodetección con oro coloidal de antígenos reconocidos por anti-RGII en cortes ultrafinos de células infectadas de nódulos de guisantes 10 días después de la inoculación (A, B). En nódulos de plantas control (A) se observa marcaje en la zona correspondiente a membrana peribacterioidea (mpb) mientras que anti-RGII no marca simbiosomas en nódulos deficientes en B (B).

Con el objetivo de estudiar la naturaleza del antígeno reconocido por Anti-RGII en la membrana peribacterioidea, se realizaron “inmunodots blots” (Fig.58 A) con muestras de extractos de filtrados de nódulos control y deficientes en B, así como fracciones de mpb purificada. Se observó señal para los extractos crudos tanto de nódulos control como deficientes, debido a la presencia de RGII, polisacárido de la pared celular. En cambio, el anticuerpo reaccionó con la mpb purificada de nódulos control pero no con la de nódulos –B. El tratamiento posterior de los extractos con metaperiodato sódico (Fig.58 B) provocó la pérdida de reactividad con el anticuerpo, confirmando la existencia de azúcares en los antígenos reconocidos por anti-RGII también en la membrana peribacterioidea, que debían ser por tanto glicoproteínas o/y glicolípidos.



**Figura 58.** (A) Inmunodetecciones con anti-RGII en muestras fijadas sobre nitrocelulosa (“dots”) de extractos de nódulos control (1), extractos de nódulos deficientes en B (2), mpb de extractos de nódulos control (3) y mpb de extractos de nódulos deficientes en B (4). (B) Inmunodetección con anti-RGII tras el tratamiento con metaperiodato sódico; la desaparición de la señal indica la presencia de componentes carbohidratos en los antígenos reconocidos por anti-RGII

Con el fin de avanzar en la caracterización de dichos antígenos, se solubilizaron extractos de mpb purificada tras el fraccionamiento de nódulos y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Posteriormente, fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con anti-RGII. Estos ensayos se realizaron también en membranas purificadas de raíces sin infectar. Como se observa en la figura 59 A, aparecieron 3 bandas con un tamaño aproximado de 50, 75 y 150 kD en mpb correspondiente a extractos de nódulos control (calle 1). Se pudo además comprobar la presencia de estas bandas en fracciones de membrana purificada de raíz sin infectar de plantas control (calle 2). Todo ello nos permitió establecer la posible asociación de los antígenos reconocidos por anti-RGII con membranas celulares, no sólo con la mpb. Además, el tratamiento de los extractos con proteinasa K (calle 3) daba lugar a la desaparición de la señal de anti-RGII, lo que indicaba que los antígenos reconocidos por anti-RGII en membranas celulares eran glicoproteínas (a las que llamaremos a partir de ahora glicoproteínas-RGII). Por el contrario, no hubo señal para el caso de las muestras deficientes de B (calle 4). MAC 206 (anti-glicolípido de la mpb) se usó como control positivo, y como se observa en la figura 59 B, tanto las muestras mpb de nódulos control como -B, así como las tratadas con proteasa, reaccionaron con el anticuerpo.



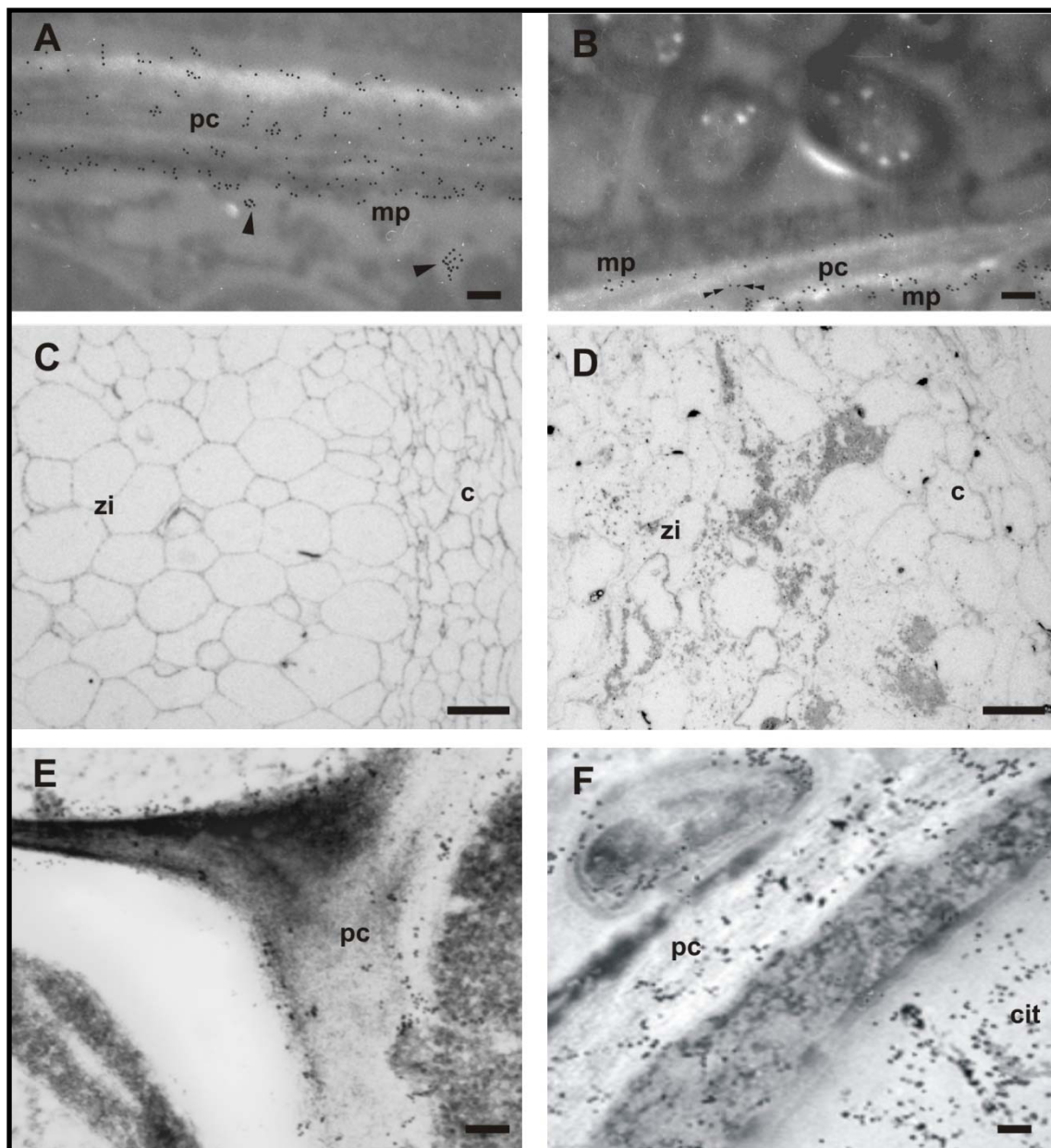
**Figura 59.** Inmunodetecciones en fracciones purificadas de membrana peribacteroidea y de raíz de guisante 3 semanas después de la inoculación, control y deficientes en B, separadas en geles de poliacrilamida-SDS y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. (A) Detección de antígenos reconocidos por anti-RGII sobre mpb de nódulos control (Calle 1), sobre membrana de raíz no infectada (Calle 2), sobre mpb de nódulos control tratada con proteinasa K (calle 3) y sobre mpb de nódulos deficientes en B (Calle 4). (B) Tinción con MAC206 (que reconoce a un glicolípido de membrana) como control de carga, apareciendo señal en mpb de nódulos control (Calle 1), deficientes en B (Calle 2) y tras el tratamiento de mpb de nódulos control con proteinasa K (Calle 3).

Puesto que las glicoproteínas-RGII aparecen principalmente asociadas a mpb en zonas donde existe un intenso tráfico de vesículas, como es la zona de proliferación y diferenciación de bacteroides, cuya alteración en deficiencia de B ya se ha descrito en estudios previos (Bolaños y col. 2001), y teniendo en cuenta que estas glicoproteínas también aparecen asociadas a membrana plasmática de raíz, estudiamos inmunocitológicamente el tráfico de vesículas con material de pared celular y la secreción del mismo durante la organogénesis del nódulo y su posible relación con dichas glicoproteínas-RGII asociadas a membrana (Fig.60).

Así, aunque anti-RGII marca la pared tanto de nódulos control como deficientes en B, éste es aparentemente menos intenso en los últimos, sugiriendo una menor presencia de la pectina en estas paredes (como se mostró anteriormente en la figura 46). Estudios inmunocitoquímicos con anti-RGII en cortes ultrafinos mostraron que el marcaje aparece de forma uniforme en paredes celulares control (Fig.60 A). A veces se pueden apreciar vesículas, que también aparecen marcadas con anti-RGII, en proceso de fusión a la región de la membrana plasmática (puntas de flecha). De esta manera, parte de esa señal de anti-RGII, localizada en la región de la membrana plasmática, correspondería a



glicoproteínas-RGII asociadas a membranas, y la otra parte a la pectina secretada a la pared celular. Por el contrario, en paredes deficientes en B (Fig.60 B), el marcaje con anti-RGII aparece más reducido y asociado con zonas cercanas a la membrana plasmática en vez localizarse en el interior de la pared celular, donde apenas hubo señal (puntas de flecha dobles), sugiriendo que, en ausencia de glicoproteínas RGII, la secreción de la pectina fallaría en deficiencia de B.



**Figura 60.** Inmunodetección de pectinas en nódulos de 3 semanas control (A, C y E) y deficientes en B (B, D y F); (A y B) Microscopía electrónica de cortes ultrafinos de nódulos marcados con anti-RGII, donde se muestra señal en vesículas, membrana plasmática (mp) o en pared celular (pc); (C y D) inmunodetección con oro coloidal e intensificación con plata de cortes semifinos marcados con JIM5, anticuerpo monoclonal que reconoce al homogalacturonano, una pectina de pared celular. Se observa en ésta última una distribución anormal de la pectina al encontrarse acumulada en el citosol (cit) de células deficientes en B; (c), córtex del nódulo; (zi), zona de infección. Barra de escala: 0,2 mm (A y B); 0,1 mm (C, D, E y F).

El marcaje con el anticuerpo monoclonal JIM5, que reconoce a otra pectina de la pared celular, concretamente al ácido poligalacturónico (homogalacturonano) en paredes celulares de nódulos control (Fig.60 C, E), apareció acumulado en el citosol en células deficientes en B (Fig.60 D, F), lo que confirmaba un tráfico o fusión vesicular anormal bajo la deficiencia de B.

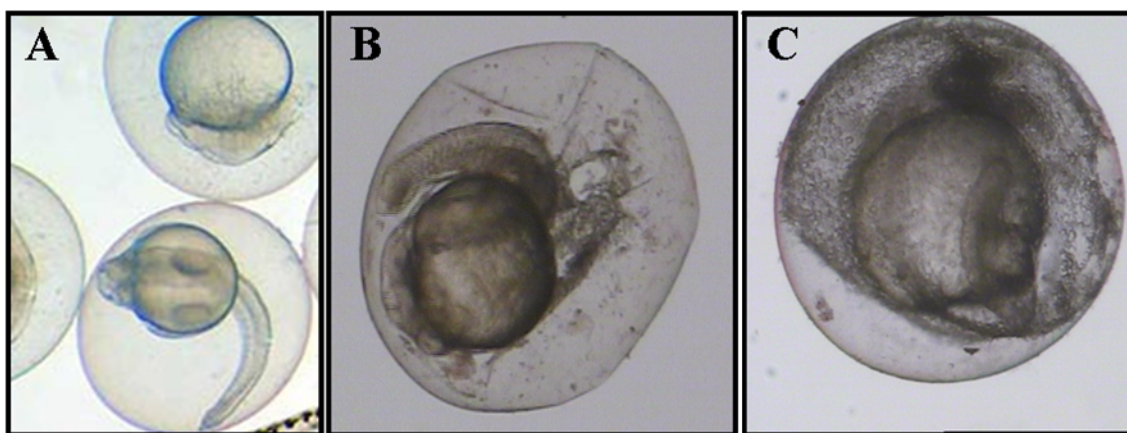
El fallo de los sistemas de secreción de material por fusión de vesículas sería responsable de la alteración de la diferenciación de bacteroides y simbiosomas, pero también podría tener los mismos efectos aberrantes sobre la diferenciación celular durante el desarrollo de órganos como los nódulos o las raíces, tal y como describimos anteriormente (Fig.55).

### **6.3 Extensión del papel del B a procesos de organogénesis animal (*Danio rerio*)**

Algunos autores sugieren una esencialidad del B en el desarrollo embrionario animal (Rowe y Eckhert, 1999; Fort y col., 1999). Así, extendiendo la posible implicación del B en fenómenos de organogénesis, se llevaron a cabo estudios en animales, concretamente en pez cebra (*Danio rerio*). Los ensayos consistieron en incubar huevos fecundados de pez cebra en medio de crecimiento al que se le había eliminado las posibles trazas de B, mediante incubación con Amberlita IRA-743 (tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos).

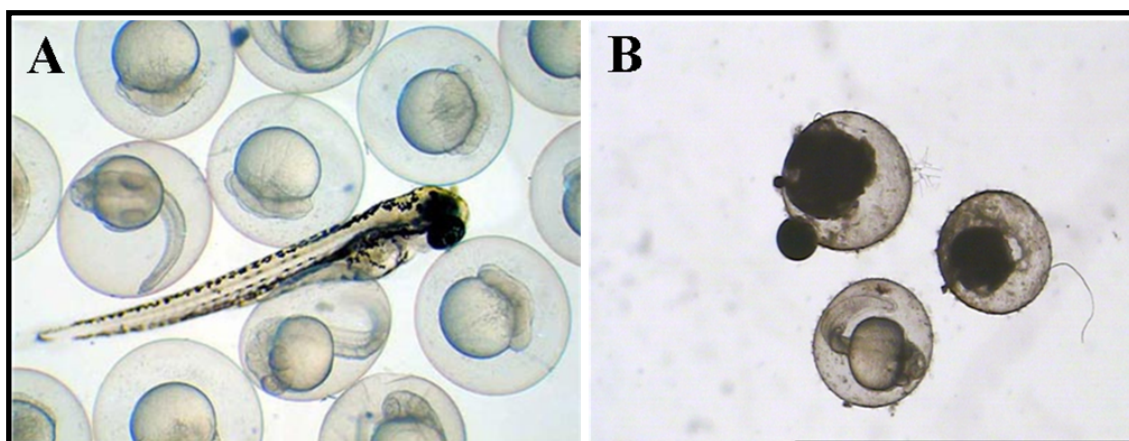
La inducción de la deficiencia de B se aplicó en distintos momentos del desarrollo en diferentes tandas de experimentos.

Independientemente del momento en que se transfirieron los huevos fecundados a medios sin B, siempre se observó, pasadas unas 12 horas, una alteración estructural en el corion del huevo (Fig.61). Además, dependiendo del tipo de tratamiento, se pudieron observar malformaciones en el desarrollo embrionario.



**Figura 61.** Embriones de pez cebra 22 horas post-fertilización desarrollándose en medio control (A) y 12 (B) ó 22 horas post-fertilización (C) desarrollados en medio deficiente de B, en los que se observa una contracción del corion además de una anormal estructura del huevo.

Si los huevos eran traspasados a medios sin B prácticamente de forma inmediata tras la fecundación (en estadio no superior a 8 células), la mayoría de los mismos abortaba (entre un 75-85%, de 3 ensayos distintos con 30 embriones cada uno de ellos) tras unas horas, apareciendo una masa celular indiferenciada (Fig.62), sugiriendo un papel del B en la diferenciación celular.

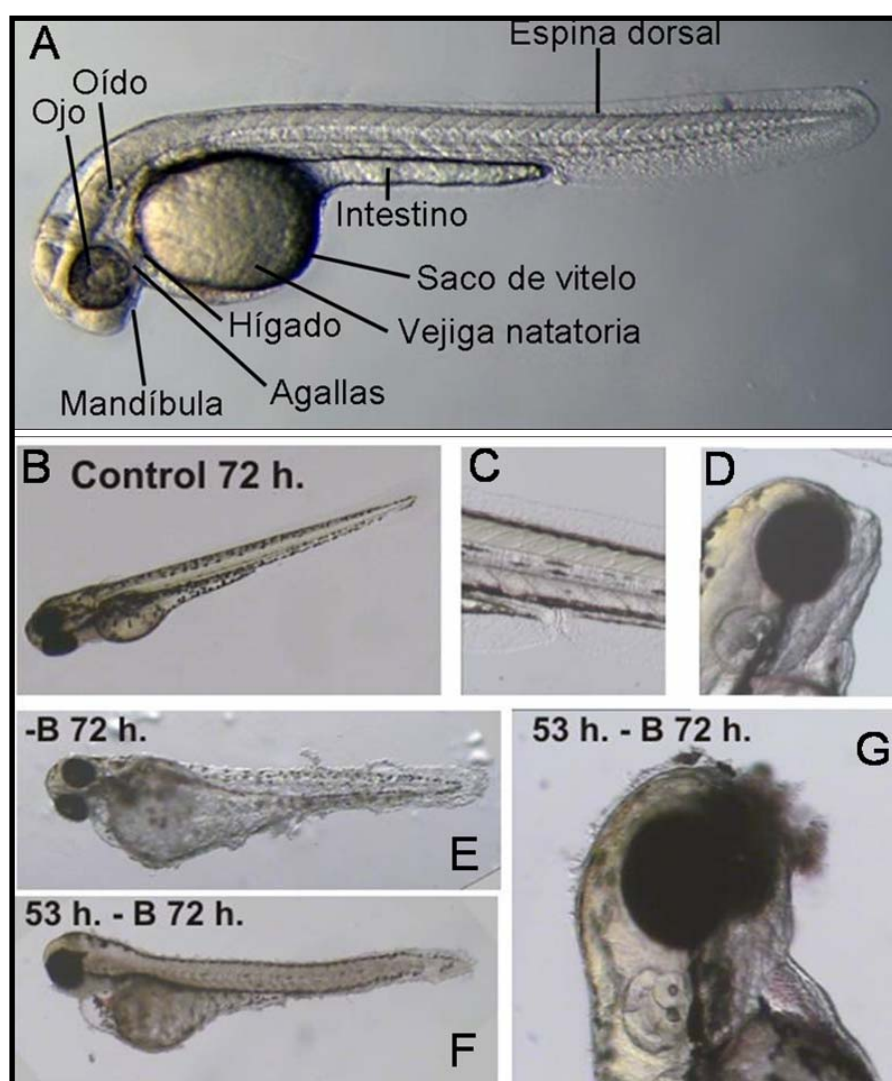


**Figura 62.** Embriones de pez cebra, (A) en distintos estadios de desarrollo en medio control y (B) 22 horas después de la fecundación y desarrollados en medio deficiente de B, donde se observa una masa celular indiferenciada en aquellos embriones que no llegaron a sobrevivir, y también se observan embriones que llegaron a sobrevivir, aunque con malformaciones.

Cuando los embriones se sometían a deficiencia de B unos 30 minutos tras la fecundación (en un estadio de 256 células o superior), los huevos llegaban a eclosionar prácticamente en su totalidad, pero, comparadas con larvas control (Fig.63 B-D), éstas

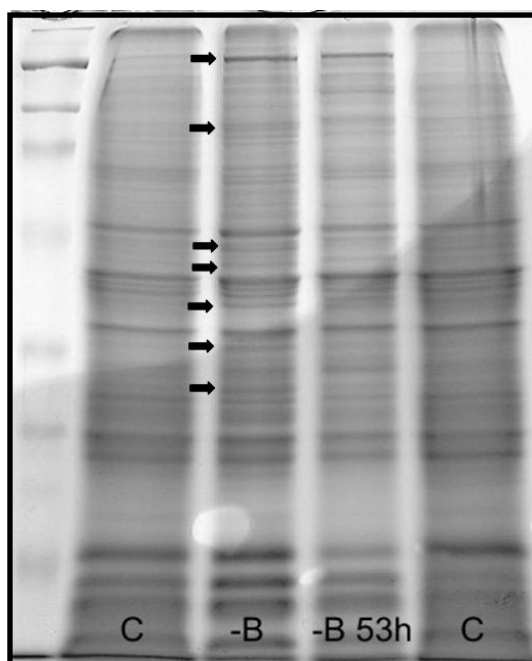
presentaban anomalías en el desarrollo de órganos como las aletas, la boca o el aparato circulatorio unas 72 h tras la fecundación (Fig.63 E), y morían a las 96 h.

Por último, puesto que el desarrollo de estos órganos tiene lugar entre las 60 y 70 h, se realizó una tanda de experimentos en que se transfirieron los huevos a medios deficientes de B 53 h tras la fecundación. Unas horas después (70-72 h tras la fecundación) aparecieron los mismos efectos de la deficiencia de B sobre la organogénesis, incluso de forma más acusada, indicando un alto requerimiento del micronutriente en esta ventana de desarrollo larvario (Fig.63 F, G).



**Figura 63.** A) Esquema anatómico del pez cebra 96 horas post-fecundación. B) Pez cebra 72 horas post fecundación desarrollado en condiciones control. En C y en D se pueden observar tanto las aletas, como los ojos y mandíbula desarrollados de forma normal. E muestra el desarrollo del pez crecido en medio deficiente de B tras la fertilización, F y G muestran el desarrollo del pez induciendo la deficiencia de B 53 horas post fertilización. De hecho, en G se puede observar la aparición de malformaciones en mandíbula y ojos.

Los perfiles proteicos de larvas de pez zebra desarrolladas bajo deficiencia de B, inducida bien en estadio de 256 células como previo a la organogénesis de aletas y mandíbulas (53 h), mostraron grandes diferencias con los de larvas control, destacando la sobreinducción de una serie de bandas (Fig.64).



**Figura 64.** Perfil proteico de homogeneizados de pez cebra crecidos en condiciones control (C), en medio deficiente de B en el estadio de desarrollo de 256 células (-B) e induciendo la deficiencia 53 horas después de la fecundación. Señaladas con flechas aparecen algunas de las bandas que se inducen en deficiencia de B.

Al igual que en nódulos, se intentaron identificar algunas las bandas que presentaron diferencias en el tratamiento deficiente mediante espectrometría de masas MALDI TOF. Las proteínas inducidas en deficiencia de B que fueron identificadas se recogen en la tabla 19. Entre ellas destacan proteínas que en condiciones normales están ligadas a citoesqueleto, a membranas, o implicadas en el metabolismo de carbohidratos y procesos respiratorios, síntesis de proteínas, procesos de secreción o en organogénesis, indicando una función crucial del B en el desarrollo animal similar a la descrita para el de nódulos.



Banda	Acceso	Proteína identificada	Organismo	Masa nominal teórica (M <sub>r</sub> ) kDa	Masa experimental (kDa)	Cobertura de secuencia (%)	Score*	Número de péptidos
1	XP_001336239	Miosina tipo II	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	222,821	151,36	21%	150	16
		Miosina, polipéptido pesado 1	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	223,038	151,36		148	23
2	XP_001336239	Miosina tipo II	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	222,821	128,82	21%	103	15
3	NP_944590	Aconitasa	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	85,548	97,7	32%	131	12
4	AAI07495	Enolasa 3	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	47,118	61,66	45%	124	5
	AAV85516	Factor alfa 1 de elongación de la síntesis de proteínas en eucariotas	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	50,314	61,66	38%	92	4
6	NP_919358	Aldolasa 1 fructosa-bifosfato	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	40,228	42,6579	40%	120	10
10	XP_001336239	Miosina tipo II	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	22,2821	138,03	18%	106	18
11	AAH63946	Heat shock 70kDa protein 5 (proteína regulada por glucosa)	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	72,117	79,43	41%	201	14
12	NP_998296	Proteína hipotética LOC406405 (malato deshidrogenasa)	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	35,797	36,3078	4%	85	1
	CAK11233	Sintaxina 1b	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	33,488	36,3078	4%	82	1
	NP_571322	Deshidrogenasa láctica D4	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	36,391	36,3078	4%	54	1
13	NP_001013489	Proteína hipotética LOC541344 (peroxiredoxina)	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	22,203	22,3872	5%	67	1
	NP_001003843	ATP sintasa	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	22,525	22,3872	5%	63	1
	NP_001002586	Proteína hipotética LOC436859 (beta cristalina 1b)	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	23,945	22,3872	6%	82	1

\* Score obtenido de acuerdo con el algoritmo Mascot (Perkins D. N, 1999) ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))

**Tabla 19.** Listado de proteínas inducidas bajo deficiencia de boro y analizadas mediante espectrometría de masa MALDI TOF

## ***DISCUSIÓN***

---





## DISCUSIÓN

Que el B constituye un nutriente con función estructural (Matoh, 1997) por el anclaje que ejerce entre dos moléculas de RGII en la pared celular de plantas está absolutamente demostrado (O'Neill y col., 2001, 2004), pero dicha función se entiende insuficiente para dar cabida a todo el conjunto de efectos que de su deficiencia derivan. Además de las alteraciones que se producen de manera rápida a nivel bioquímico y fisiológico en plantas (Brown y col., 2002), como se ha señalado, los recientes ensayos de deficiencia en animales, cuyas células carecen de pared celular, revelan su posible implicación en el mantenimiento estructural de las membranas y matrices biológicas, en su funcionalidad y en procesos de señalización probablemente ligados a la misma.

Además, el hecho de que la deficiencia de B afecte en mayor medida a tejidos en desarrollo respecto a aquellos maduros (Bell y col., 2002), como muestran las alteraciones que aparecen en zonas meristemáticas (Fig.2 C), es indicativo de que el micronutriente podría estar implicado en la diferenciación y organogénesis, tanto en vegetales como en animales, y el estudio de estos procesos en deficiencia de B podría ser clave para el esclarecimiento de las funciones que el B puede desempeñar.

Dentro de los modelos biológicos propuestos para el análisis de la funcionalidad del B en los seres vivos, el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa ofrece la posibilidad de analizar el papel del B durante un proceso en el que acontecen fenómenos de división celular, diferenciación y organogénesis, que culminan con la generación de una nueva estructura, el nódulo, y aparecen de manera secuencial en nódulos indeterminados (Newcomb y col., 1979). En este sentido, dentro de este proceso interactivo planta-bacteria, se puede estudiar la implicación del B tanto a nivel estructural como en la mediación de interacciones celulares y moleculares. De hecho, trabajos anteriores de nuestro grupo avalan la existencia de un fallo en la interacción planta-bacteria desde las etapas iniciales del proceso simbiótico, con una reducción en la síntesis de flavonoides, una disminución en la inducción de los genes *nod*, un descenso de bacterias adsorbidas a la raíz, la aparición de canales de infección abortados

y una capacidad de invasión mermada por alteración del fenómeno de endocitosis (Redondo-Nieto y col., 2001). Además, los efectos de la deficiencia en simbiosis, trasladados a estadios más tardíos, se pueden ampliar a la aparición de una acusada alteración en el desarrollo de simbiosomas (Bolaños y col. 2001), por desestabilización de la mbp (Fig.44), quizás debida a una alteración de algunas glicoproteínas de membrana (Fig.57), y a una defectuosa organogénesis del nódulo (Fig.55), que se traducen en un fallo en la consecución del proceso simbiótico.

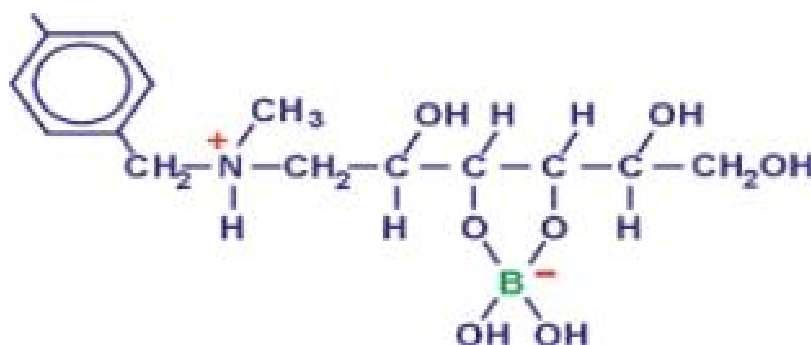
De forma similar, extendiendo el estudio de la deficiencia de B a un modelo animal (pez cebra), tanto el proceso de desarrollo embrionario como la organogénesis, mostraron la existencia de alteraciones en ausencia del micronutriente (Rowe y Eckhert, 1999; y Fig.61 a 63), poniendo de manifiesto la participación del micronutriente también en el desarrollo animal.

Como se ha comentado, conseguir una deficiencia del micronutriente en cualquier sistema vivo es arduo complicado al ser requerido en cantidades ínfimas, del orden micromolar. Además, las técnicas analíticas para la detección de ligandos de B con función biológica, hoy por hoy, ofrecen no pocas restricciones, y suponen una importante limitación en el estudio de la implicación del B en los distintos procesos biológicos. No obstante, parece razonable predecir que el mecanismo de acción de este elemento está vinculado a su capacidad de formar complejos con moléculas ricas en grupos hidroxilo (Bolaños y col., 2004a). De hecho, las dos únicas funciones hasta ahora demostradas en seres vivos, están ligadas a la formación de ésteres con grupos *cis*-diol en compuestos como el ya descrito RGII de la pared celular vegetal o en el autoinductor AI2 implicado en comunicación bacteriana. Sin embargo, la detección de otros ligandos de B, con funciones probablemente cruciales en procesos de desarrollo, pero con poca concentración celular, resulta hoy por hoy un reto complicado.

En los últimos años se han propuesto algunas metodologías encaminadas al análisis de las posibles funciones del B más allá de la pared celular. En el trabajo de Bassil y col. (2004), por ejemplo, se propone la utilización de ácidos borónicos (fenilborónicos), que compiten por los mismos sitios de unión del borato para inducir de forma reversible deficiencia de B, gracias a la unión de esos compuestos a moléculas con grupos *cis*-diol, y estudiar sus efectos *in vivo*. La problemática que esta metodología revela, es la

incapacidad de formar “puentes” intermoleculares como ocurre con el borato, al tener únicamente dos grupos hidroxilo libres, lo que limitaría el reemplazo del borato por el boronato en ciertas moléculas. Siguiendo en el contexto del desarrollo de nuevas metodologías, también se han propuesto métodos de detección del B en base a sus propiedades atómicas, utilizando técnicas como la denominada “espectrometría de la pérdida de energía electrónica” (EELS), utilizada en localización del B en tejidos (His y col., 2001) o la utilización de técnicas que discriminan entre los dos isótopos del boro:  $^{10}\text{B}$  y  $^{11}\text{B}$  (mediante la denominada “radiografía de captura de neutrones” o NCR) (Thellier y col. 2001), pero ambas presentan limitaciones en la detección de ligandos de B *in vivo*. Asimismo, ensayos realizados por nuestro grupo, en colaboración con el Institut für Pflanzenernährung de la Universidad de Bonn, revelaron que otras técnicas propuestas, como la utilización del FITC-B, anteriormente descrito, (en resultados que no se muestran en el presente trabajo) presentan restricciones que impiden emplearla como un sistema de detección de ligandos de B.

Con todo, parece fundamental encontrar una metodología adecuada que no solo permita localizar la distribución del B en tejidos, sino también determinar las moléculas biológicas susceptibles de interaccionar con él. Es por esto que en nuestro estudio desarrollamos una técnica utilizando la Amberlita IRA-743, resina capaz de acomplejar B gracias a la presencia de grupos funcionales de N-metil glucamina (Asad y col., 1997), como se observa en la figura 65, en la que, junto con el B, quedarían “atrapados” aquellos componentes unidos o susceptibles de unirse a él.



**Figura 65.** Grupo funcional N-metil glucamina de la Amberlita IRA-743, ligado a un grupo borato (en verde)

La solubilización de los componentes de nódulos ligados a la Amberlita gracias a la presencia de B, y su resolución mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, nos permitió identificar entre ellos, tres moléculas que, a priori, serían potenciales ligandos de B: la pectina RGII (Fig.23), la glicoproteína de matriz AGPE reconocida por MAC265 (Fig.23) y el transportador de oxígeno leghemoglobina (Fig.19 y 21). Estos tres componentes aparecieron ligados a la resina de forma significativa únicamente en extractos de nódulos control y no en extractos de nódulos carentes del micronutriente, lo que resultaba ciertamente lógico dada la necesaria presencia de B para posibilitar el anclaje a Amberlita. Además, la utilización del Dowex como resina control, permitió descartar la presencia de uniones inespecíficas. Con ello, y atendiendo a las características de unión a la Amberlita, se podría afirmar que la interacción de componentes de extractos de nódulos con la resina, puede proponerse como una metodología apta para la captación de borato o componentes ligados a éste mediante dos enlaces éster (complejos monoborato) (Fig.65). La problemática o limitación que presentan los fenilborónicos la encontramos también en este tipo de metodología en tanto en cuanto la importancia de monoésteres entre componentes biológicos y borato parece limitada a nivel fisiológico (Goldbach y Wimmer, 2007), siendo en principio las uniones bis *cis*-diol las que aparecen con mayor relevancia biológica. No obstante, aunque no sean funcionalmente activos, presumimos posible la formación, dentro de la dinámica celular, de compuestos monoborato, al menos, como paso previo a la formación del complejo bis(diol) borato (Fig.1), de aquí su posible interacción. Además, determinados compuestos con función biológica ya descritos anteriormente, como es el caso de las monoadenosinas (Ralson y Hunt, 2001), que establecen *in vitro* enlaces *cis*-diol monoborato, y la posibilidad de unión al N de grupos aminos de proteínas, mediante enlaces covalentes, como se describe para las serin proteasas (Hunt, 2003), ofrecen distintas posibilidades de monoésteres con posible función biológica, dentro de la compleja química del B.

Otra limitación de esta técnica, tal y como la hemos aplicado, viene dada por el hecho de que ninguna de las moléculas identificadas constituyen componentes de membrana, pues son compuestos secretados extracelularmente (como ocurre con AGPE), o son componentes de pared (como RGII) o son macromoléculas citosólicas (como la leghemoglobina), todos ellos con una concentración importante en los nódulos.

Además de los resultados obtenidos en este trabajo, son numerosos los estudios que proponen la implicación del B en estabilización y funcionalidad de las membranas celulares (entre otros: Goldbach, 1997; Bolaños y col., 2001; Brown y col., 2002; Goldbach y Wimmer, 2007), gracias a la posible interacción de glicoproteínas y glicolípidos con B. Pese a ello, la metodología diseñada para la captación de posibles ligandos no detectó ningún componente de membrana, probablemente debido a la baja capacidad extractiva y de concentración de proteínas integrantes de la misma en la metodología utilizada (gradiente de sacarosa y posterior solubilización adaptado de Brewin y col., 1985). Se requeriría una masa muy grande de nódulos para poder obtener extractos más enriquecidos en proteínas de membrana. Es por esto que parece necesario mejorar la técnica, complementándola con otros procedimientos que permitan detectar complejos de membrana de unión a B.

Aún con estas limitaciones, la identificación de RGII, AGPE y leghemoglobina como potenciales ligandos de B nos ha permitido profundizar en el posible papel del micronutriente en relación con la función de estas moléculas durante la simbiosis rizobio-leguminosa.

Durante el desarrollo del nódulo, existe una intensa remodelación de pared y membrana (Brewin, 2004), lo que hace de este órgano un buen recurso para estudiar el papel estructural del B. De hecho, dentro de la sintomatología que su deficiencia produce, encontramos paredes irregulares con un anormal ensamblaje de sus constituyentes. De entre ellos, como se ha descrito, destacan la reducción en el ensamblaje de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (como la codificada por *ENOD2*) (Bonilla y col., 1997a) y los cambios en el contenido y distribución de pectinas (Redondo-Nieto y col., 2003). Teniendo en cuenta que una de las moléculas identificadas como posible ligando fue el RGII, con una fracción unida a Amberlita (Fig.33 calle 1), se han de analizar sus características para comprender su vinculación con la resina.

De acuerdo a lo establecido por O'Neill y col. (2004), dos monómeros de RGII se unirían gracias al anclaje ejercido por el B entre los respectivos residuos de apiosa de la cadena A, por lo que en esta interacción, al quedar “bloqueados” los sitios de unión a B, no podrían interaccionar con la resina. Se ha de tener en cuenta que en la molécula quedan libres los residuos de apiosas de la cadena B (Reuhs y col, 2004), susceptibles

de interacción con B. Por otro lado, el RGII contiene otros azúcares con sitios potenciales de unión a B, como la L-fucosa. De hecho, retomando el trabajo ya descrito de Reuhs y col. (2004), se establece que en el mutante de *Arabidopsis mur-1*, el reemplazo de la L-fucosa por L-galactosa, se traduce en la existencia de malformaciones a nivel de pared, que pueden ser “aliviadas” por la adición de B al medio. Esto denota la posible existencia de otros azúcares que interaccionarían con B, formando monoboratos y posibilitando su unión a la resina, tal y como ya se había sugerido en otros trabajos (Findelee y Goldbach, 1996). Por el contrario, en deficiencia de B, no se produciría tal interacción al no existir B como elemento de anclaje a la resina (Fig.33 calle 2).

La forma no polimerizada de AGPE también apareció asociada a la Amberlita (Fig.23), con una mayor intensidad de unión en muestras control respecto a las muestras deficientes de B, que carecerían de B necesario para la unión a la resina (Fig.29). Las características en cuanto a composición de esta macromolécula, gracias al alto contenido en hidroxiprolina y azúcares como la L-arabinosa, D-galactosa, el ácido glucurónico, la L-ramnosa y la D-arabinosa, hacen de ella una molécula capaz de interaccionar con B y constituir en sí un ligando.

Otra de las moléculas que apareció asociada a la Amberlita fue la leghemoglobina (Lb). Ésta es una proteína no-glicosilada cuya estructura y composición señalan a priori más una interacción indirecta que directa a la resina. Dentro de las posibles interacciones directas, la unión de la Lb a B se basaría en la interacción con grupos amino, como ocurre en las serin proteasas (Hunt, 2003) o en el transportador no porfirínico de oxígeno hemeretrina, del gusano *Golfingia gouldii* (Garbett y col., 1971), o bien estableciendo enlaces por puentes de hidrógeno con aminoácidos constituyentes de la molécula, como ocurre en la molécula AI2 con la serina, treonina o arginina (Chen y col., 2002). Por otro lado, parece lógico pensar en la interacción indirecta debida a la presencia de moléculas que intervendrían como mediadoras del vínculo Lb-B. De hecho, el proceso de purificación del transportador de oxígeno revela la presencia de  $\text{NAD}^+$  asociado a Lb (Becana, *comunicación personal*), que podría actuar como intermediario en la unión a Amberlita, gracias a su capacidad de asociarse a B (Raltson y Hunt, 2001). Otra posibilidad es que el  $\text{NAD}^+$  aparezca asociado a la Lb gracias al anclaje ejercido por B. En todo caso, sería sumamente interesante estudiar la posible unión covalente del B con la Lb, con o sin participación del  $\text{NAD}^+$ , y su

implicación fisiológica. Por otro lado, los resultados presentados, revelan que la interacción Lb-Amberlita está condicionada por la presencia de B. Efectivamente, en ausencia de B la síntesis o/y estabilidad de la Lb resulta alterada (Fig.21), por lo que es lógico no encontrar señal bajo esas condiciones. Esto además viene avalado por el análisis de expresión génica de la Lb 5-10, en el que a pesar de observarse una reducción en la actividad del gen en condiciones deficientes (Fig.47), ésta no explicaría la completa pérdida de la proteína, lo que hace pensar en un efecto post-transcripcional o post-traducciona del B. Un efecto similar ha sido descrito en trabajos donde se recoge la existencia de una alteración post-transcripcional de la Lb en nódulos ineficientes de guisante (Govers y col., 1989). Concretamente, uno de los mutantes que describe el trabajo resulta en la generación de bacteroides indiferenciados, que presentan por ello similitud con el efecto existente bajo deficiencia de B. En este sentido, sería necesario analizar si la alteración en el mantenimiento post-transcripcional del transportador de oxígeno se debe a una acción directa del B o bien si es consecuencia del anómalo desarrollo de los bacteroides.

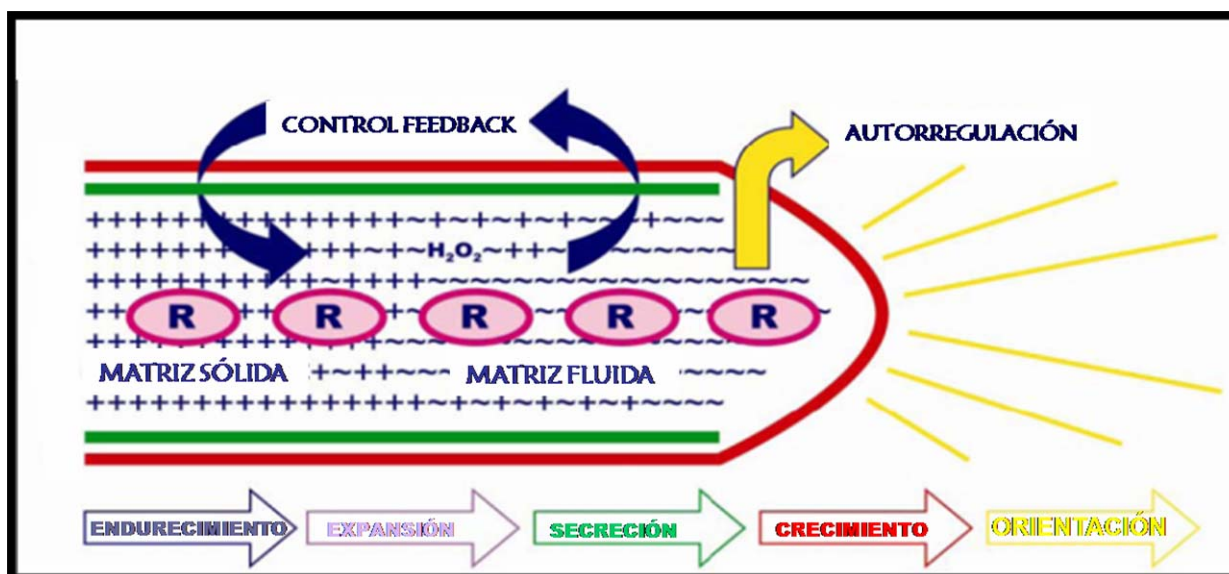
Como se comentó anteriormente, la identificación de estos tres componentes como posibles ligandos de B nos ha permitido abordar su comportamiento en relación con la presencia o ausencia del micronutriente durante el desarrollo de la simbiosis, y relacionarlos con algunos de los efectos de la deficiencia de B encontrados en nódulos de leguminosas.

Según se ha descrito en anteriores trabajos del grupo, la deficiencia de B afecta a la infección e invasión celular, debido a que se ve truncado el desarrollo de canales de infección y el fenómeno de endocitosis (Bolaños y col., 1996; Redondo-nieto y col., 2001). El desarrollo del nódulo indeterminado, requiere que los rizobios invadan la planta a través de dicha estructura transcelular polarizada, dentro de la cual se dividen, crecen y progresan las bacterias hacia el primordio nodular, atravesando asimismo la matriz glicoproteica que integra el lumen del canal. En un momento dado, van a surgir puntos en el ápice del canal, desprovistos de pared por donde el rizobio va a excretarse en forma de gotas de infección, previo a la endocitosis (Brewin, 1991). La matriz glicoproteica, donde quedan embebidas las bacterias, posee un constituyente mayoritario exclusivo de leguminosas denominado AGPE (“Arabinogalactan Extensin”) o extensina rica en arabinogalactano, antes conocida como RNE (“Root Nodule

Extensine”), que, como se ha descrito, es una glicoproteína altamente glicosilada (Rathbun y col., 2002). Este constituyente es liberado a la luz del canal como respuesta temprana a la infección promovida por el rizobio (VandenBosch y col. 1989; Rae y col, 1992), y parece ensamblarse a la pared del canal gracias a que posee residuos de Tyr que actuarían como diana de la polimerización oxidativa ejercida por el peróxido de hidrógeno (Wisniewski y col. 2000; Brewin, 2004). Asimismo, esta glicoproteína rica en hidroxiprolina, parece asociarse a las superficies cargadas negativamente como ocurre con la superficie bacteriana, y, de acuerdo a lo demostrado *in vitro*, el B parece mediar en dicha asociación previniendo la unión de la glicoproteína a la superficie del rizobio (Bolaños y col., 1996). Además, se ha sugerido que el B puede actuar en el anclaje de la glicoproteína a pared, permitiendo el crecimiento del canal (Rathbun y col., 2002).

Así, y de acuerdo con el modelo propuesto por Brewin (2004) sobre el crecimiento polarizado del canal de infección, la AGPE se secretaría al ápice del canal de infección en desarrollo, y precisamente en esta zona, la matriz fluida atraparía a la bacteria. Por acción de distintos sistemas enzimáticos (DAO, NADH-oxidasa o la SOD), responsables de la generación del peróxido de hidrógeno, se produciría la polimerización y solidificación de la matriz (Fig.8), posibilitando la progresión bacteriana. Paralelamente, en la zona apical del canal, continuaría la secreción de más matriz, dirigiendo su crecimiento. Así, la división de las células microbianas acontecería fundamentalmente en el ápice del canal (Gage, 2004), y detrás de dicha zona, la matriz polimerizaría progresivamente. Como se observa en el esquema (Fig.66), el peróxido de hidrógeno “anclaría” progresivamente la AGPE, y esta solidificación controlaría el crecimiento y división de las bacterias en las zonas ya maduras del canal.





**Figura 66.** Modelo de crecimiento apical del canal de infección. En él se propone que la matriz glicoproteica, en la que se encuentra AGPE, promovería el crecimiento apical del canal gracias a su ensamblaje mediado por peróxido de hidrógeno, y en el que los residuos Tyr ejercerían de diana de dicha polimerización. Gracias a su ensamblaje, los rizobios podrían atravesar el canal y sus divisiones quedarían localizadas en el ápice (Gage, 2004). De esta manera, existiría un equilibrio entre la AGPE que se secretaría al lumen del canal (forma soluble) y aquella integrada en la pared del canal (forma insoluble). El canal, rodeado de pared primaria de la célula vegetal, crecería conformando un cilindro que atravesaría el citoplasma de las células vegetales. Adaptado de Brewin, 2004.

Utilizando MAC265 en la detección de AGPE en nódulos de guisante, se observó que en deficiencia de B tenía lugar una alteración en el desarrollo de canales de infección, presentándose disminuido su número (Fig.35 A y B). Atendiendo al estudio del reconocimiento de la AGPE con MAC265 en extractos de nódulos de guisante 3 semanas post-inoculación, se observó que, en muestras deficientes, no existía una reducción en la cantidad de glicoproteína respecto a los extractos control, pero en ellos se presentó predominantemente la forma soluble de la glicoproteína, de tamaño 95 kDa (Fig.29 calle 4), sin apreciarse la banda de menor movilidad. Por otro lado, la presencia de B pareció favorecer, como es lógico, la asociación de la glicoproteína a la Amberlita (Fig.29, calle 1), y a su vez, la presencia de este micronutriente, bien en muestras control (Fig.29, calle 3) o bien en muestras tratadas con bórax (Fig.34), condicionó la aparición de una banda de alto peso molecular (175 kDa). Por el contrario, en muestras de extractos deficientes, la asociación de la glicoproteína a la resina fue débil (Fig.29 calle 2), de manera similar a la señal inespecífica que apareció en la resina control Dowex (Fig.29 calles 5 y 6), tanto para muestras control como para deficientes, probablemente debido a la capacidad de la AGPE de adherirse a superficies cargadas negativamente. Todos estos resultados indican que la AGPE es susceptible de

interaccionar con borato o complejos-borato, lo que puede afectar tanto al crecimiento del canal de infección como a la capacidad invasiva de la bacteria, tal y como se describirá más adelante.

Para el caso de extractos de nódulos determinados, de acuerdo a lo obtenido en la inmunodetección de MAC265 en extractos de judía de 3 semanas post-inoculación (Fig.30), donde únicamente aparece señal de la forma soluble de 95 kDa, se deduce que la banda de menor movilidad y de alto peso molecular relativo (175 kDa), que aparece en extractos de nódulos control de guisante, puede ser característica de canales de infección. Efectivamente, la presencia de canales de infección en nódulos determinados es transitoria y sólo unas pocas células son invadidas. La infección transcurre por división mitótica de las células inicialmente infectadas, lo que explicaría la ausencia de la banda de baja movilidad en nódulos determinados, que sería característica de pared del canal.

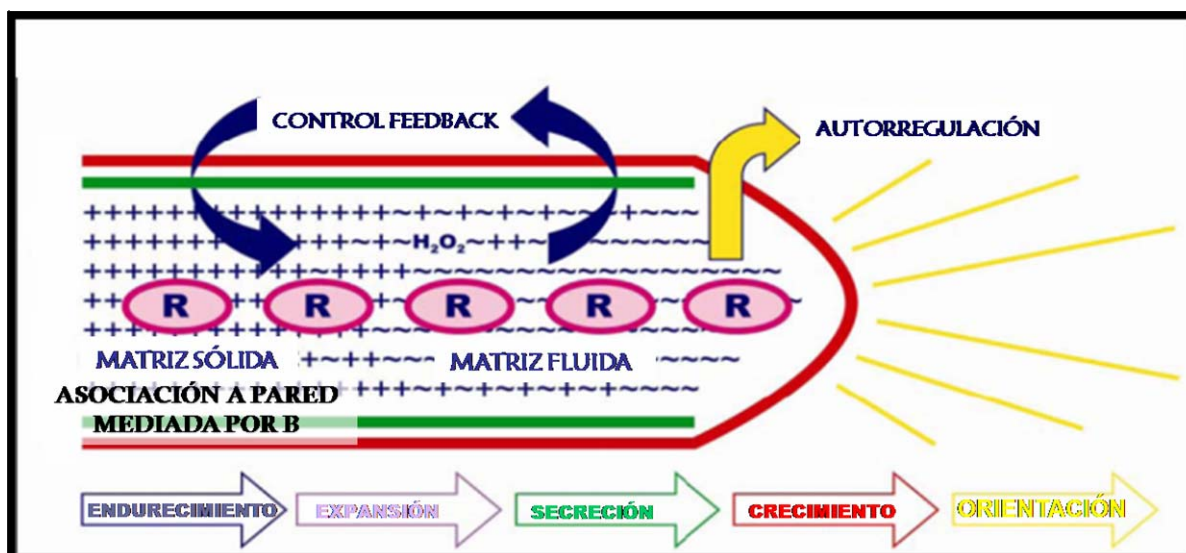
De acuerdo con lo observado, la banda de mayor peso molecular relativo reconocida por MAC265 presentaba una movilidad coincidente a la presentada por RGII en la inmunodetección realizada en extractos de nódulos (Fig.31 A y B). Así, se pensó en una posible interacción entre la pectina y la glicoproteína de matriz en los nódulos, avalada en principio, por la coincidencia en el marcaje de ambos anticuerpos. La inmunoprecipitación de MAC265 y posterior inmunodetección con el mismo anticuerpo, indicaron un enriquecimiento de la banda de alto peso molecular reconocida por MAC265 en extractos control (Fig.31 B calles 1 y 7), desapareciendo casi por completo en extractos de nódulos deficientes (Fig.31 B calles 5, 6 y 8). En la inmunoprecipitación con Anti-RGII y posterior inmunodetección con MAC265, se observó la aparición de señal en extractos de muestras control y deficientes (Fig.31 C calles 12 y 13). De esta manera, los ensayos de inmunoprecipitación cruzada, revelaron que la banda de 175 kDa podía corresponder a un componente glucídico específico de nódulos reconocido tanto por MAC265 como por Anti-RGII, donde el B podría desempeñar un papel como mediador al quedar patente la existencia de una señal, mayoritaria en condiciones control respecto a las deficientes (Fig.31 C calles 12 y 13). Por otro lado, el tratamiento con proteinasa K de las muestras (Fig.32), mostró que el epítipo glucídico reconocido por MAC265 se encuentra asociado a una proteína y no a la pectina RGII, ya que desapareció en las muestras tratadas con proteasa,

permaneciendo sólo el marcaje con anti-GII. Así, los resultados obtenidos sugerían la existencia de una asociación pectina RGII-glicoproteína AGPE, posiblemente mediada por B. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un tratamiento *in vitro* con bórax en extractos de nódulos control y deficientes (Fig.34), previa separación del pellet (con contenido fundamentalmente bacteriano, bacterias y bacteroides, y restos celulares no solubilizados) y la fracción soluble del nódulo. Posteriormente, la inmunoprecipitación con MAC265 y posterior inmunodetección con el mismo anticuerpo reveló que la banda de 175 kDa que permaneció en el sobrenadante de los extractos control tras la adición de boro en forma de bórax (Fig.34 calles 1 y 3, respectivamente), disminuía su presencia en el pellet de las mismas muestras control (Fig.34 calles 2 y 4, respectivamente) apoyando la idea del papel del B en la pérdida de asociación entre AGPE y la superficie bacteriana (Bolaños y col., 1996). En muestras deficientes, la banda de menor movilidad de la AGPE apareció en el pellet de los extractos (Fig.34 calle 6), y tras el tratamiento con bórax se observó una disminución de su presencia en el pellet (Fig.34 calle 8) y la aparición de la misma en el sobrenadante de los extractos (Fig.34 calle 7), lo que indicaba un posible efecto en la resolubilización de la glicoproteína gracias a la adición de bórax. De esta forma, este ensayo apoyaría la idea de la posible mediación del B en la asociación AGPE-RGII, idea que, además explicaría el hecho de que esta banda no apareciese asociada a Amberlita (Fig.29), ya que el B susceptible de interaccionar con la resina podría estar involucrado en la unión entre AGPE y RGII.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Bolaños y col. (1996), en la inhibición por B de la asociación *in vitro* entre dicha glicoproteína y la superficie de *Rhizobium* que llevaron a postular que el B actúa como modulador en dicha interacción, interviniendo en el proceso de infección e invasión, nuestros resultados con extractos de nódulos sugieren que el B promueve la asociación AGPE-RGII, que podría tener importancia estructural durante el crecimiento de los canales de infección, disminuyendo a su vez la interacción AGPE-*Rhizobium*, lo que podría facilitar la progresión de la bacteria dentro del canal y su posterior entrada por endocitosis. De hecho, recientemente se ha demostrado la existencia de una zona libre de matriz entre la bacteria y el punto de crecimiento del canal (Fournier y col., 2008). Así, su interacción con AGPE en deficiencia de B podría efectivamente impedir su progresión.

Todos estos resultados e hipótesis fueron avalados por lo observado en los estudios inmunohistoquímico e inmunocitoquímico con MAC265 (Fig.35). En éstos se confirmó la aparición de menos estructuras infectivas en nódulos deficientes (Fig.35 B), quedando restringida su aparición al tejido central de dichos nódulos, indicando un menor desarrollo de canales de infección, lo que explicaría la reducción en la capacidad de invasión que presentan. Como se observa en el estudio inmunocitoquímico con MAC265 sobre cortes de nódulos control y deficientes (Fig.35 C-F), los canales de infección desarrollados bajo deficiencia de B aparecen desestructurados, y las bacterias embebidas en su interior muestran un contacto directo con la matriz, algo que no ocurre en condiciones control. Este resultado avala *in vivo* el hecho de que la presencia de B previene la asociación de la AGPE con la superficie bacteriana (Fig.35 C-F), pues en condiciones control la bacteria aparece rodeada de un halo dentro del canal que muestra que no existe un contacto directo entre ésta y la matriz glicoproteica (Fig. 35 C y E). Por otro lado, esa asociación que aparece en deficiencia podría ser responsable de que las bacterias muestren un aspecto de degradación, posiblemente debido al estrés que sufren en el interior del canal que culminaría con el aborto de la infección bajo dichas condiciones.

Con todo, y según los resultados obtenidos y observaciones realizadas, se puede establecer que el B, en base al modelo propuesto por Brewin antes descrito (2004) (Fig.66), sería necesario para la estabilización de la interacción entre la matriz y la pared, estabilización que resultaría en la rigidez requerida por el canal de infección para su crecimiento (Fig.67). En deficiencia de B, la glicoproteína permanecería en su forma soluble, sin ensamblar a pared, y la bacteria quedaría embebida en una matriz no rígida dentro de una estructura de crecimiento indeterminado y no polar, como los característicos canales de infección anormalmente desarrollados en nódulos –B (Fig.35 D y E; Bolaños y col., 1996; y Redondo-Nieto y col., 2001).



**Figura 67.** Papel del boro en el crecimiento apical del canal de infección adaptado del modelo de crecimiento apical propuesto por Brewin (2004) (Fig.66). Se muestra cómo la presencia de B condiciona el crecimiento apical y polarizado del canal, por intervenir en la asociación RGII-AGPE. La pérdida en la interacción truncaría el ensamblaje de la AGPE a pared, quedando la bacteria (R) atrapada en la matriz, cuyo acúmulo resultaría en el abortamiento del canal infectivo.

Como hemos observado, aparecen un conjunto de alteraciones estructurales en el canal, que terminan por generar una barrera física, constituida por la acumulación de la matriz glicoproteica, que impide que los rizobios progresen a través de él. Como se ha descrito anteriormente, tanto los polisacáridos superficiales bacterianos (Frayse y col., 2003) como los glicoconjugados provenientes de la planta (Kannenberg y Brewin, 1994), van a estar implicados en interacciones que llevan a la supresión de respuestas de defensa de la planta. Así, el tipo de interacciones que conducen al desarrollo anormal de la infección bajo deficiencia de B, ha sido descrito en trabajos basados en interacciones simbióticas mediadas por mutantes en polisacáridos superficiales (Perotto y col., 1994), en donde se describe la existencia de una acumulación de componentes de matriz junto con un conjunto de alteraciones estructurales que culminan en un fallo en el proceso simbiótico y en el desencadenamiento de una característica respuesta citológica de defensa traducida en una reducción de la infección bacteriana e inhibición de la proliferación y desarrollo de bacteroides.

En este sentido, como se ha detallado en apartados anteriores, bajo deficiencia de B existe una alteración en el desarrollo de simbiosomas, que aparecen como estructuras aberrantes (Fig.45), lo que parece consecuencia de un fallo en la glicosilación de glicoproteínas (Bolaños y col., 2001) que interaccionarían con el LPS rizobiano

(Bolaños y col, 2004b). La apariencia de los bacteroides desarrollados bajo deficiencia, con una desestabilizada mpb, señalaría la importancia del papel que juega el B en las interacciones entre las superficies celulares de los simbios.

Se ha de tener en cuenta que el proceso simbiótico ha sido considerado, por gran parte de la literatura científica, como un fenómeno controlado de interacción incompatible (Rolfe & Gresshoff, 1988) dadas las similitudes que se encuentran entre los procesos simbióticos y patogénicos. En general, el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio tiene lugar gracias a una cascada de señalización que está finamente regulada con el fin de evitar la existencia de una respuesta de defensa por parte de la planta. Desde este punto de vista, parece que el rizobio es capaz de bloquear el proceso de defensa desencadenado en la planta ante la interacción con patógenos, siempre bajo el control de la propia planta.

Desde las etapas iniciales del proceso simbiótico, con el reconocimiento de los factores Nod, se ha descrito la existencia de una supresión de respuestas de defensa, incluyendo una reducción en la acumulación del ácido salicílico (Martínez-Abarca y col., 1998) o en la generación de ROS (Shaw y Long, 2003). De hecho, se ha descrito que los factores Nod, como sustrato de quitinasas, desencadenan una respuesta defensiva en la planta cuando son adicionados en no leguminosas (Staehelin y col., 1994). Además, están implicados en la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Savouré y col. 1994, 1997; Spaink, 1995; Schmidt y col., 1992), componentes de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana. De la misma manera, los polisacáridos superficiales bacterianos, como se ha escrito, van a jugar un papel clave en la supresión de las respuestas de defensa.

En el caso del exopolisacárido (EPS), se han descrito distintas implicaciones en el control de la respuesta de defensa (Frayse N. y col., 2003). Así, mutantes en el EPS I o succinoglucano son capaces de provocar una característica respuesta de defensa por alcalinización fuerte del medio. También, mutantes en la síntesis del EPS pueden provocar la acumulación de polifenoles en el medio o de etileno, traducándose en una disminución de la nodulación. Al igual que ocurría con los factores Nod, el EPS está involucrado en la acumulación de fitoalexinas. Todo ello hace pensar en el papel del EPS como señal supresora de la defensa, que la planta puede activar en contacto con el

rizobio. Recientemente, se ha descrito que el EPS bacteriano, por su naturaleza polianiónica, se encuentra implicado en el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  del apoplasto al citosol, que a su vez supone un requisito para la expresión de genes de defensa. Así, el EPS participaría en la supresión de la respuesta de defensa desencadenada tanto por microorganismos simbioses como por patógenos (Aslam y col., 2008).

Para el caso del LPS, se pueden encontrar trabajos que establecen su implicación en la supresión de la generación de especies reactivas de oxígeno (Albus y col., 2001). Por otro lado, como se ha descrito, el trabajo de Perotto (1994) recoge la activación de una respuesta citológica de defensa, traducida en una disminución o desaparición de la capacidad invasiva de la bacteria. Además, se ha demostrado que el pre-tratamiento con LPS impide la respuesta hipersensible así como la producción de ácido salicílico en interacciones tanto compatibles como incompatibles (Newman y col., 1997, 2002). En este sentido, la acción del LPS se ha mostrado presente en todo el proceso interactivo, siendo responsable de un reajuste de transcritos relacionados con respuestas de defensa, denotando una acción más allá del mero control del “estallido oxidativo” (Tellström, V. y col., 2007).

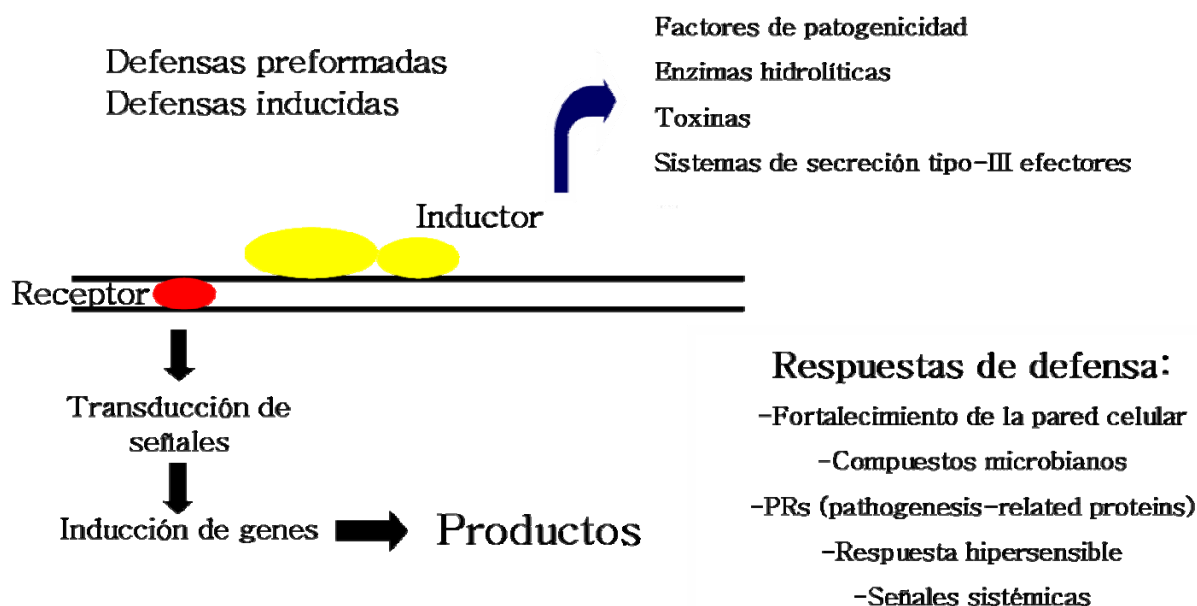
Otros polisacáridos superficiales, como los glucanos cíclicos, también jugarían un importante papel en este proceso, tanto en la producción de fitoalexinas (Mithöfer y col., 1996, 2001), como en el incremento del calcio citoplasmático (Mithöfer y col., 1999) o en la generación de especies reactivas de oxígeno (Mithöfer y col., 2001).

Además de los polisacáridos, los sistemas de señalización de *quorum sensing* y *quorum quenching*, que regulan la comunicación interbacteriana, pueden desencadenar respuestas de defensa (Bauer y Mathesius, 2004; Zhang, 2003; Soto y col., 2006).

La reorganización del citoesqueleto, participe del proceso de simbiosis, también parece otorgar un importante grado de similitud entre el proceso simbiótico y patogénico. Como se ha escrito, en asociaciones compatibles, existe una reestructuración o reensamblaje del citoesqueleto que permite, entre otras cosas, la progresión del canal de infección y el desarrollo del nódulo. En interacciones no compatibles, parece que va a jugar un papel distinto, en tanto en cuanto se opone a la progresión o entrada de ciertas

estructuras del patógeno, como las hifas de hongos patógenos, tal y como se describe en cebada en el trabajo de Kobayashi y col (1997).

Como se muestra en la figura 68, además de los distintos factores de patogenicidad, como la alteración en los polisacáridos superficiales o en los factores Nod, otros componentes actúan como inductores de la respuesta de defensa en plantas. Entre ellos, cobran importancia los sistemas de secreción, que van a ser claves en interacción planta-microorganismo. Además de condicionar el rango hospedador tanto en interacciones simbióticas como patogénicas, los sistemas de secreción tipo 3 (T3SS) en rizobios secretan las denominadas “proteínas externas de nodulación” (Nodulation Outer Proteins, en inglés) o Nops, que, entre otras funciones, van a estar involucradas en distintas vías de transducción de señales durante el proceso simbiótico, incluyendo vías que culminan en la inducción de las denominadas “patogénesis-related proteins” (en inglés) o “proteínas relacionadas con patogénesis” (Soto y col., 2009).



**Figura 68.** Representación esquemática de la manifestación de una respuesta de defensa en plantas. La aparición del inductor desencadena una cascada de señalización celular que culmina con la inducción de genes que provocan distintos tipos de respuestas de defensa en la planta, entre los que se encontraría la inducción de proteínas relacionadas con patogénesis (pathogenesis-related proteins) PRs.



Así, dentro de las respuestas de defensa que la planta adopta ante la presencia de distintos inductores, de acuerdo a lo indicado en el esquema (Fig.68), se incluyen las denominadas pathogenesis-related proteins (PRs), cuya presencia fue detectada en muestras de nódulos desarrollados bajo deficiencia (Fig.25; Tabla 17), y al menos una de ellas, ABR17, también se indujo por mutantes en polisacáridos superficiales rizobianos (Fig.42), indicando la existencia de respuestas características de defensa por parte de la planta.

Estas proteínas PRs se dividen en 17 familias de acuerdo con su actividad biológica y sus características estructurales (Liu y col., 2006). Entre ellas, las PR10, grupo en el que se incluye ABR17 y PR10.1 (Fig.25; Tabla 17), son una familia de proteínas de tamaño aproximado de entre 15 y 18 kDa, de carácter ácido, activas en el citoplasma y con estructuras tridimensionales similares (Van Loon y col., 1994). Son inducidas bajo estreses bióticos (Riggleman y col., 1985) y abióticos (Kav y col., 2004). La inducción de PR10 se describió por primera vez en el proceso infectivo del hongo *Fusarium solani* en guisante (Fristensky y col., 1985). Posteriormente también se ha descrito su inducción en otras leguminosas como respuesta a patógenos (Nyamsuren y col. 2003; Colditz y col. 2004). En este sentido, algunos de los ensayos realizados fueron encaminados a determinar si la inducción de este tipo de proteínas era un efecto provocado por una alteración en los requerimientos nutricionales, como respuesta a un estrés abiótico (deficiencia de B), o bien se debía a un fallo en el reconocimiento rizobiano, como respuesta a un estrés biótico, desencadenado bajo deficiencia de B.

En este sentido, los resultados obtenidos mostraron la existencia de diferencias entre la inducción constitutiva en raíz infectada (Fig.37) y no infectada (Fig.38). Encontrar que la inducción en raíz inoculada control (Fig.37) fue unas 100 veces superior a la inducción en raíz no inoculada control (Fig.38), reveló que la presencia del microorganismo tenía un efecto en la inducción de la señal, apoyando la hipótesis de que la alta inducción en nódulos deficientes en B sería, al menos en parte, una respuesta ligada a un fallo en el reconocimiento bacteriano, ya que la raíz podría reconocer como potencial patógeno a cualquier microorganismo, activando la síntesis de PRs, mientras que, en el punto de infección, el rizobio, en condiciones normales, suprimiría dicha respuesta, no siendo así en deficiencia de B o en interacciones con mutantes en polisacáridos superficiales. Aún así, no se podía descartar la acción del estrés abiótico

en la inducción causado por la deficiencia de B, ya que, aunque con menor intensidad que en los nódulos, esta ocurre también en raíces –B no infectadas.

Así, si bien existían diferencias en la inducción de ABR17 en el tejido radicular entre las muestras control y las deficientes, la mayor inducción de ABR17 en nódulo sugería que esta proteína podía estar ejerciendo un importante papel en la inhibición del proceso infectivo e invasivo en las interacciones incompatibles estudiadas. La figura 37 muestra la inducción temporal de ABR17 durante las 3 primeras semanas de desarrollo nodular. En ella se observa una diferencia notable entre el tejido desarrollado en condiciones control respecto al desarrollado en deficiencia, algo que no ocurría en raíz. A pesar de existir señal de anti-ABR17 en condiciones control, ésta se mantuvo a bajo nivel durante las 3 primeras semanas de desarrollo, lo que fue apoyado por los resultados obtenidos en el análisis transcripcional del gen *abr17* (Fig.40), en donde se observó un nivel basal bajo en la expresión. En cambio, en condiciones deficientes, se observó una mayor inducción proteica respecto a extractos de nódulos control en la primera semana de desarrollo, incrementándose en la segunda semana, y manteniéndose en la tercera semana de desarrollo. Este comportamiento en la expresión proteica y génica, no permitía descartar entre efectos estrictamente debidos a estrés biótico o nutricional, pero el comportamiento en nódulos y raíces infectadas o no infectadas en deficiencia de B sugirió la idea de que posiblemente la planta, bajo un estrés nutricional severo, indujera este tipo de respuestas de defensa como mecanismo de alerta ante un posible ataque patogénico. De hecho, ésta podría ser, como se ha comentado, la razón de la aparición de expresión constitutiva a nivel radicular, y la expresión basal observada en nódulos control, que sería incrementada en caso de un estrés de B o una interacción incompatible, aspecto propuesto en trabajos anteriores (Mylona y col., 1994)

En este sentido, el estudio realizado en nódulos inducidos por mutantes en polisacáridos bacterianos (Fig.42) vino a demostrar que existía una inducción de ABR17 ligada posiblemente a un fallo en el reconocimiento bacteriano, con una señal distribuida por toda la superficie nodular, de manera similar a lo que ocurría en nódulos deficientes (Fig.43), como parte de un mecanismo de prevención de la infección. Como se ha descrito, la presencia del EPS previene al rizobio de la interacción con glicoconjugados de la planta (Bolaños y col. 2004), y la inducción de ABR17 en pseudonódulos resultantes de la interacción con B551 o B659, que poseen una alteración en

polisacáridos superficiales, es concordante con la descripción del papel supresor de respuestas de defensa del EPS y del LPS (Frayssse y col, 2003). Además, para el caso del LPS, existen trabajos que describen su acción en la supresión de la expresión de genes de defensa (Tellström y col. 2007), por lo que su alteración podría dar sentido a la inducción de ABR17 en nódulos inducidos por el mutante B659. En este mutante ya se había descrito, como se ha comentado, la existencia de una respuesta citológica de defensa, junto con otros mutantes en el LPS bacteriano, que daban lugar a simbiosomas anormales (Perotto y col. 1994), tal y como ocurre en deficiencia de B. No obstante, la simbiosis inefectiva resultante de la interacción con estos mutantes, también podía generar un efecto secundario de estrés nutricional debido al fallo en la fijación de nitrógeno, que también ocurre en deficiencia de B, de tal forma que tampoco se puede descartar la incidencia de un estrés nutricional en la alta inducción de ABR17 en estas interacciones. El desarrollo de experimentos de inducción a tiempos cortos tras la inoculación, cuando aún no existe falta de N, podrá ayudarnos a discernir entre estas dos hipótesis.

No obstante, dadas las alteraciones observadas en las estructuras de infección y endofíticas inducidas por mutantes en el LPS, es razonable suponer que el LPS participa en la supresión de respuestas de defensa durante la formación del canal y del simbiosoma. Así pues, de forma similar a lo que ocurre con el LPS bacteriano, la deficiencia de B va a afectar a componentes que interaccionan con la superficie bacteriana, durante la infección (Bolaños y col. 1996) y durante el desarrollo simbiosomal (Bolaños y col. 2001; 2004b) y el diálogo planta-bacteria se ve alterado dando lugar a un fenotipo de nódulo muy similar al de nódulos inducidos por mutantes en polisacáridos bacterianos, por lo que ambas modificaciones, de componentes moleculares o de interacción en deficiencia de B, pueden tener efectos comparables.

Dentro de la familia PR10, PRs como ABR17 y PR10.1, se han descrito como proteínas con actividad ribonucleasa (Moiseyev y col., 1994; Srivastava y col., 2006b, 2007) y por ello han sido vinculadas a la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos. Aunque este aspecto de la familia PR10 parece cuestionado por la existencia de inducción de algunas PR10 durante el crecimiento y desarrollo normal de la planta (Liu y col., 2003), los resultados en la inmunocitoquímica con Anti-ABR17 revelaron la existencia de bacterias endofíticas en estadio de degradación posiblemente por actividad

lítica (Fig.44 D), apoyando la tesis de una actividad ribonucleasa inherente a dichas proteínas.

Por otro lado, la inducción de las PR10 también se ha vinculado con el aumento de la tolerancia a distintos estreses abióticos (Srivastava y col., 2006a; Krishnaswamy y col., 2008), relacionándose con la variación en el contenido hormonal (incremento de citoquininas y disminución de ABA) (Srivastava y col., 2006b). Esto puede encontrar explicación en el hecho de que ABR17 se trate de una proteína de respuesta a ácido abscísico (ABA). En relación a esto, la expresión constitutiva de estas proteínas parece mejorar la germinación en plantas de *Brassica napus* bajo condiciones de salinidad (Srivastava y col., 2004). En este sentido, la hipótesis de inducción debida a estrés abiótico estaría apoyada por el hecho anteriormente descrito de la capacidad que tiene el B de inhibir a la ADPRc por su unión al  $\text{NAD}^+$  (Eckhert y col., 2007; Barranco y col., 2008). El ADPRc ejerce de mediador de las respuestas a ácido abscísico (ABA) (Grill y Himmelbach, 1998; Sánchez y col., 2004). Así, en deficiencia de B podría verse aumentada la generación de ADPRc, provocando una sobreinducción de respuestas ligadas a ABA, como podría ser la expresión y síntesis de estas PRs.

Lo que se puede deducir de todo esto es que la activación de respuestas características de defensa por parte de la planta ante estreses bióticos o abióticos está en estrecha relación, siendo sumamente complicado discernir qué desencadenante es el responsable del efecto inductor de este tipo de proteínas.

En general, durante todo el proceso simbiótico, va a existir la posibilidad de que la interacción y desarrollo de la simbiosis, torne a una interacción incompatible. De hecho, el propio proceso de senescencia del nódulo se ha descrito como respuesta a la existencia de señales que provocan que la planta identifique a la bacteria como un microorganismo patógeno, y así se desencadene el fenómeno de senescencia (Mellor, 1989; Puppo y col., 2005). En relación a esto, las características descritas para los tejidos *in vivo* deficientes presentan un proceso, al menos similar, al de senescencia prematura (Fig.45), en lo que parece una acción lítica del compartimento simbiosomal (Mellor, 1989). En este sentido, ha sido descrita la inducción de estas proteínas en procesos senescentes (Lui y col, 2006; Sikorski y col. 1994; Lers A. y col., 1998; Hanfrey y col. 1996) tanto en hoja como en nódulo, por lo que se llevaron a cabo

ensayos en nódulos y hoja senescentes (7 semanas post-inoculación) (Fig.41), observándose un incremento de señal en muestras control aunque nunca comparable a lo acontecido en nódulos deficientes en B. Así, si bien es cierto que la senescencia puede inducir la síntesis de estas proteínas (Fig.41), la elevada señal en nódulos -B no se corresponde con una característica inducción por un fenómeno de senescencia en nódulos control, ya que se mantiene prácticamente con la misma intensidad durante todo el desarrollo.

En base a los ensayos realizados, se puede establecer que la consecución del proceso simbiótico va a depender de la supresión de respuestas de defensa (Mithöfer, 2002) y que algunas de estas, como la inducción de ABR17, pueden desencadenarse tanto por factores bióticos como abióticos, preparando a la planta ante posibles ataques patogénicos.

Además de la inhibición de la infección en deficiencia de B por inducción de posibles mecanismos de defensa incluyendo la barrera física generada en el canal de infección por el fallo en la polimerización de matriz, la pérdida de interacción AGPE-RGII en ausencia de B podría incidir en la regulación de la difusión de oxígeno, por alteración estructural. De hecho, la AGPE, cuya secreción también se produce a los espacios intercelulares de tejidos no infectados (Rae y col., 1991), se ha visto implicada en la regulación de la barrera de difusión de oxígeno (Janetta y col., 1993).

La inmunodetección del epítipo reconocido por MAC203, antígeno O del LPS de *R. leguminosarum* 3841 crecido en condiciones microaeróbicas y/o a pH muy ácido (Kannenberg y Brewin, 1989) puede ser utilizada como una medida indirecta del nivel relativo de O<sub>2</sub> en el interior del nódulo, ya que también se expresa en bacteroides de la zona de fijación de N<sub>2</sub> (Kannenberg y col., 1994), donde el pH no puede ser tan extremadamente ácido como para inducir este epítipo, pero sí existe un ambiente microarobio.

La señal de MAC203 en fracciones de bacteroides procedentes de nódulos control pero no de deficientes en B, indicaba la existencia un ambiente microaeróbico en nódulos control (Fig.49) y una alteración en el ambiente endofítico en nódulos deficientes (Fig.49), quizás debida a una posible alteración en la barrera de oxígeno. La figura 45,

muestra cómo en el córtex del nódulo deficiente se presenta una alteración en la localización de MAC265 en los espacios intercelulares, que podría ser responsable de la difusión de oxígeno al interior del nódulo. Así, la capacidad potencial de la AGPE de unirse a B, previamente descrita, podría ser la base en la estabilidad de la barrera de difusión de oxígeno en nódulos.

Por un lado, la reducción en la elasticidad (Findelee y Goldbach, 1996) y el incremento en la porosidad de la misma (Fleischer y col., 1999) que se produce en condiciones de ausencia de B, contribuirían al aumento del traspaso de oxígeno hacia el interior del nódulo, y por el otro, la posible interacción de la AGPE a la red pectínica asociada a B, podría estabilizar la matriz extracelular, inestable en condiciones de carestía del micronutriente (Fig.45 y 46), mejorando la adhesión intercelular a la que también contribuyen las pectinas, y más concretamente la formación del dímero B-RGII (Iwai y col., 2002). De hecho, la figura 46 sugiere que la cantidad de RGII ligado a las paredes celulares es menor en nódulos deficientes en B, si comparamos el nivel de intensidad de la señal de anti-RGII, comparada con la que se detecta en nódulos control (Fig.46 E y G...).

Además del RGII y la AGPE, la Lb 5-10 parece ligarse a Amberlita, y su presencia depende de la presencia de B, en tanto en cuanto se observa su desaparición en condiciones de deficiencia, tanto para nódulos determinados (Fig.22) como indeterminados (Fig.19).

En leguminosas, las Lbs son codificadas por una familia de genes que dan lugar a distintos isómeros, cuyo número varía en función de la especie. En el caso de guisante, existen 5 isoleghemoglobinas (Uheda y Syono, 1982), y hoy por hoy se desconocen las funciones concretas de cada una de ellas. En el caso de la Lb 5-10, existe un bajo nivel de expresión en nódulos no funcionales, mientras que parece que la Lb 120 posee el mismo nivel de expresión en nódulos funcionales y no funcionales, sugiriendo una diferencia a nivel funcional relacionado con una diferencia en la afinidad por el oxígeno (Suganuma y col., 1995; Kawashima y col., 2001). En condiciones normales, la expresión de Lb 5-10 se extiende desde estadios iniciales hasta etapas tardías de fijación (Kawashima y col., 2001), por lo que suponía un buen control en la funcionalidad del

nódulo a lo largo de su desarrollo, tal y como se corresponde con la presencia de la proteína en etapas senescentes de la planta (Fig.47).

Como se puede comprobar en la figura 47, la evolución de la inducción de la Lb 5-10 en extractos de nódulos control con el tiempo, se mantiene apenas sin variación, mientras que en deficiencia, donde aparece señal en la primera semana aunque de forma menos intensa que en extractos de nódulos control, disminuye hasta desaparecer en las siguientes semanas. Paralelamente, el análisis transcripcional del gen *Lb5-10* (Fig.48), aunque muestra una reducida expresión respecto a las muestras control en cada una de las tres semanas de desarrollo, no explica la pérdida completa de la proteína acontecida en las semanas 2 y 3, sobre todo atendiendo al incremento en la expresión génica en la semana 2, que no se correlaciona con la ausencia de proteína detectada en ese momento de desarrollo nodular, indicando un efecto a nivel post-transcripcional. En este sentido se podría teorizar sobre el posible papel del B en la estabilización de la Lb o en la inducción, bajo estas condiciones, de una actividad proteolítica.

Por otro lado, algo que ha sido descrito en numerosos trabajos, es la inhibición de la actividad nitrogenasa por la presencia de oxígeno (Hill, 1988), inhibición que ocurre en deficiencia de B (Bolaños y col., 1994; Bonilla y col., 1997a) probablemente debido a la pérdida de los mecanismos de control del oxígeno en nódulos.

Precisamente la alteración en la difusión de oxígeno al interior del nódulo podría resultar en un daño oxidativo en nódulos deficientes. De hecho, existen trabajos que defienden la existencia de un daño oxidativo en cultivos celulares privados de B (Koshiba y col., 2009). Sin embargo, de acuerdo a lo obtenido en el presente trabajo, la valoración del daño oxidativo por peroxidación de lípidos de membrana no parece mostrar diferencias entre nódulos control y deficientes de B (Tabla.18) ni tampoco la valoración del daño oxidativo a proteínas (Fig.51). Es más, el análisis de uno de los sistemas antioxidantes más importantes, la ascorbato peroxidasa (Matamoros y col., 2003) a nivel citosólico, denotó su menor actividad en deficiencia (Fig.50 B), probablemente debido a la reducción en su contenido (Fig.50 A). Todo esto conduce a pensar en que la generación de ROS en nódulos control respecto a los deficientes no presenta diferencias, y que en estas condiciones, la entrada de oxígeno al nódulo no va asociado a un daño oxidativo, aunque debería ser cuantificada la posible generación de

estas especies reactivas. Además, se ha de tener en cuenta que la actividad de la leghemoglobina contribuye significativamente a la generación de ROS en nódulos funcionales (Becana y Klucas, 1992a; Becana y col., 2000) algo que no ocurre en nódulos carentes de Lb (Günther y col., 2007), como los desarrollados bajo deficiencia de B. También, la práctica inexistencia de bacteroides activos en deficiencia de B, cuya respiración también se considera una fuente de la generación de ROS (Becana y col., 2000), explicaría el hecho de no encontrar un daño oxidativo en éstos, o al menos, no superior al existente en nódulos control.

Por tanto, la deficiencia de B daría lugar a nódulos no funcionales, en los que se verían afectados una serie de componentes, potencialmente asociados al micronutriente, que estarían involucrados en el proceso infectivo y en la regulación del nivel de oxígeno, pero sin que aparentemente se produzca un daño oxidativo.

La existencia de efectos del B sobre la embriogénesis animal (Eckhert y Rowe, 1999; Fort y col., 1999) pone especialmente de manifiesto su funcionalidad fuera de la pared celular, apuntando su acción y afección a nivel de membrana celular, cuyos componentes glicoproteicos y glicolipídicos son susceptibles a interaccionar con B (Bolaños y col., 2004a). En la interacción simbiótica rizobio-leguminosa la formación de un nuevo órgano, el nódulo, cuyo desarrollo requiere de la aparición de nuevas estructuras, los simbiosomas, conlleva la síntesis y diferenciación de componentes de membrana (Perotto y col., 1991, 1995), gracias a lo cual constituyen un buen modelo de estudio del papel del B en procesos de organogénesis y diferenciación.

Como se ha comentado en este trabajo, los efectos de la deficiencia de B se manifiestan de forma más importante en tejidos en desarrollo, así, si atendemos al análisis del perfil proteico de muestras de extractos de nódulos control y deficientes en B (Fig.52 A), se observan claras diferencias en el bandeo, aumentando con el tiempo de desarrollo, que, aunque menor medida, también aparecen en raíz (Fig.52 B) y en otros tejidos maduros como hoja y tallo (Fig. 53 y 54), indicando la posible intervención del B en los procesos de desarrollo de estos órganos.

El anticuerpo anti-RGII reconoce al epítipo de RGII cuando éste se encuentra como monómero o formando el complejo borato-RGII, y anteriormente fue descrita su señal



en pared celular (Matoh y col., 1998). El estudio inmunocitoquímico realizado con anti-RGII sobre cortes de nódulos control, reveló no solo el marcaje en la pared celular, que también se producía en nódulos deficientes (Fig.60 B) sino que además dio señal en membrana (mpb: Fig.57 A y en membrana plasmática: Fig.60 A). Por otro lado, la sensibilidad a la oxidación con metaperiodato permitió deducir que los antígenos reconocidos por anti-RGII en membrana eran, como en el reconocimiento de la pectina, de naturaleza glucídica (Fig.58), y la desaparición de la señal tras el tratamiento con proteinasa K (Fig.58 calle 3) confirmó que poseían naturaleza glicoproteica. Asimismo, en muestras fraccionadas de membrana de raíz no infectada también se observó señal del anticuerpo (Fig.58 calle 2), lo que indica que estas glicoproteínas no son específicas de membranas de células de nódulos. Por otro lado, las denominadas glicoproteínas-RGII, aparecieron fuertemente marcadas en mpb en la inmunohistoquímica de nódulos control de 1 semana post-inoculación (Fig.56 A), momento en el que los bacteroides aún no están diferenciados. En nódulos maduros, el marcaje con anti-RGII se mostró intenso en la zona II y en la interzona II-III, que aún contienen simbiosomas indiferenciados (Fig.56 C). En cambio, en la zona madura del nódulo (Zona III), donde existe actividad nitrogenasa, y en zona senescente (Fig.56 D), la señal quedó restringida a pared celular, por lo que la presencia de estas glicoproteínas se correlacionaría con las zonas de mayor diferenciación celular. Al igual que ocurre con el marcaje de estas glicoproteínas, se han descrito glicolípidos que desaparecen de la mpb durante la maduración del simbiosoma (Perotto y col., 1995). Esto permite sugerir que la desaparición de la antigenicidad frente a anti-RGII puede estar relacionada con un estado de transición entre la membrana plasmática y la diferenciación de la mpb, algo apoyado por los resultados obtenidos en nódulos deficientes, en los que no existe una diferenciación de bacteroides funcionales y en donde la señal de anti-RGII quedó restringida a la pared celular durante todo el desarrollo (Fig.56 B y E).

Teniendo en cuenta que los antígenos RGII de membrana son comunes a membrana plasmática y a mpb inmadura (Fig.59 calles 1 y 2), y conociendo los efectos de la deficiencia de B en el crecimiento celular, se puede establecer que las glicoproteínas de membrana reconocidas por RGII pueden ser requeridas en un cierto momento del proceso de crecimiento y diferenciación, y van desapareciendo progresivamente durante el desarrollo celular o durante la maduración del simbiosoma. Como ya se ha señalado, muchos estudios indican que el requerimiento de B por parte de la planta es mayor en

tejidos en crecimiento, entre los que se incluirían zonas meristemáticas, que para el mantenimiento de aquellos ya maduros (Raven, 1980). Además, el alto contenido de B en nódulos respecto al que aparece en otros tejidos (Gárate y col., 1993; Redondo-Nieto y col. 2003), revela la importancia de su requerimiento en la síntesis y formación no sólo de la pared, sino también en la formación de la gran cantidad de mpb que se precisa en nódulos.

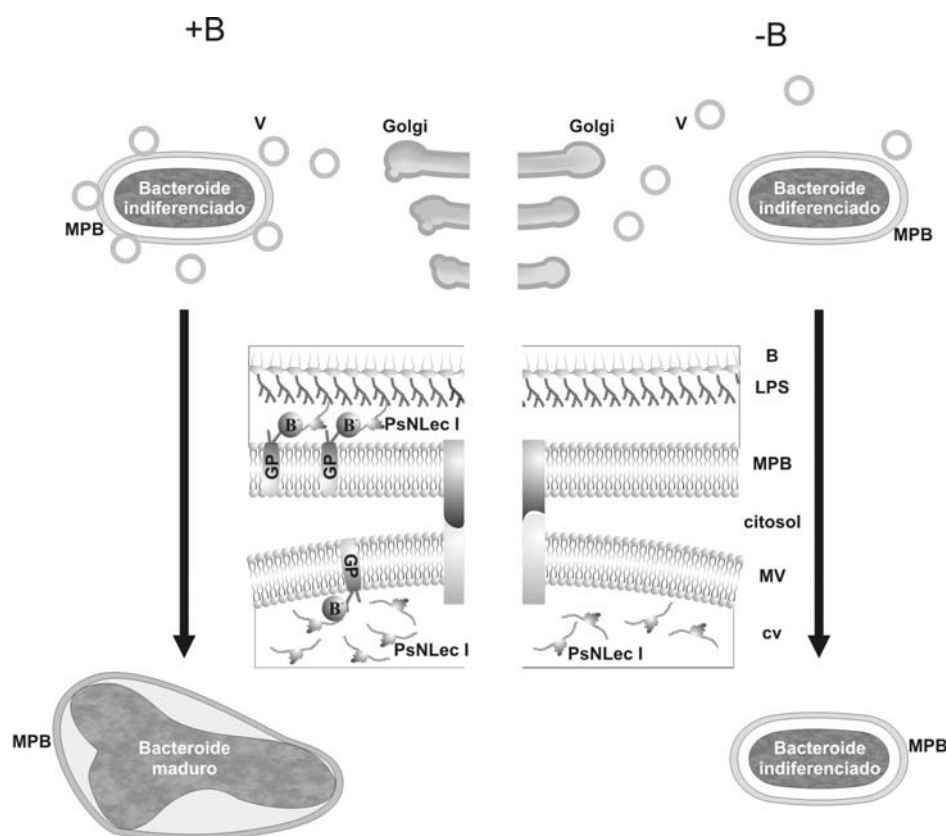
Tanto la formación de pared como de membrana, requieren de la existencia de un intenso tráfico y fusión vesicular que permite la liberación de su contenido proveniente del Golgi. En este proceso se ha descrito la implicación del B (Goldbach, 1997) posiblemente mediando interacciones entre la membrana de la vesícula y la membrana receptora, que estabilizan la fusión de ambas. La existencia de alteraciones en la fusión de vesículas con materiales de pared celular bajo deficiencia de B (Fig.60 D y F; Bonilla y col., 1997a; Redondo-Nieto y col., 2003), con una acumulación de dicho material en el citoplasma, así como el desarrollo de simbiosomas aberrantes en los que falla la secreción al fluido peribacteroideo de glicoproteínas, como las lectinas PsNLEC-1A y B (Bolaños y col., 2001), avalan un papel del B en el tráfico y fusión vesicular durante procesos de desarrollo. En este sentido, las glicoproteínas reconocidas por anti-RGII podrían ser susceptibles de interaccionar con B, interviniendo en la correcta fusión vesicular durante la síntesis de mpb, lo cual vendría a ser refrendado por el marcaje de anti-RGII localizado en zona de división simbiosomal (Zona II y II-III) en condiciones control (Fig.56 C).

La deficiencia de B no solo afecta al desarrollo de simbiosomas. Como recoge el trabajo de Redondo-Nieto y col. (2003), bajo deficiencia, existe una alteración en el anclaje de pectinas de pared debido a la pérdida de asociaciones borato-diéster con los residuos de apiosa del RGII. La figura 60 E y F, resultante del marcaje del homogalacturonano de pared con JIM5, confirma que existe una distribución anormal de pectinas bajo deficiencia de B, existiendo una acumulación citoplasmática de las mismas (Fig.60 D y F), algo que también fue observado con glicoproteínas estructurales de pared (Bonilla y col., 1997a). Por otro lado, si se observa la figura 60 A aparecen zonas, marcadas con punta de flecha, en donde existe un marcaje intenso con anti-RGII, y que parecen corresponder a vesículas, que no aparecen en secciones de nódulos deficientes en B. Por ello, parecería razonable suponer que bajo condiciones de ausencia del micronutriente

existe un fallo en la fusión vesicular ligado a la estabilidad que aportan glicoproteínas como las glicoproteínas-RGII a este proceso crucial durante el crecimiento celular.

En base a lo descrito, la anormal diferenciación de los simbiosomas en ausencia de B estaría relacionada con el fallo en la glicosilación del componente PsNLEC1 que interacciona con la mpb y la superficie bacteriana tras su secreción al fpb (Bolaños y col., 2001), que podría estar condicionada a la presencia de glicoproteínas-RGII, lo cual nos llevaría a proponer un modelo (Fig.69) sobre el papel del B en el desarrollo de simbiosomas, que podría extenderse al crecimiento celular. En nódulos control existiría una correcta diferenciación de la mpb, en la que se presentarían las glicoproteínas-RGII capaces de interaccionar con PsNLEC 1. Las glicoproteínas, quizás estabilizadas por borato, harían posible el anclaje de las lectinas a la mpb, lo que posibilitaría la posterior interacción con los lipopolisacáridos bacterianos, que culminaría en la diferenciación del bacteroide a la forma fijadora de nitrógeno. En cambio, en ausencia de B, y por tanto de glicoproteínas-RGII, no existiría fusión estable de las vesículas portadoras de la lectina, con lo que ésta acabaría por acumularse en el citosol (Bolaños y col., 2001) y no se posibilitaría la toma de contacto mediada por PsNLEC 1 que podría actuar de señalización entre la mpb y la bacteria, por lo que los bacteroides no se diferenciarían correctamente, al igual que ocurre en mutantes de guisante deficientes en la glicosilación de PsNLEC 1 (Sherrier y col., 1997) o en nódulos inducidos por mutantes deficientes en el LPS (Perotto y col., 1994).

Al igual que ocurre en mpb, las glicoproteínas-RGII no fueron detectadas en membrana del tejido radicular deficiente, pero sí en los control (Fig.59 calle 2), por lo que siguiendo este modelo, de la misma manera que ocurre en el desarrollo de los simbiosomas, la fusión vesicular durante el crecimiento celular sería inestable en deficiencia de B.



**Figura 69.** Modelo del papel del B en interacciones entre superficies celulares, durante el desarrollo de simbiosomas. Las vesículas provenientes del Golgi (V), cargadas de componentes de mpb, entre los que se incluiría la lectina PsNLEC 1 (cv) sería trasladada al compartimento simbiosomal. En presencia de boro (B), las glicoproteínas-RGII (GP) serían correctamente estabilizadas en membrana, y podrían interactuar con componentes como PsNLEC 1, que se anclaría al LPS bacteriano, posibilitando y estabilizando la fusión vesicular. Posteriormente, la asociación mpb-PsNLEC 1-bacterioide, sería necesaria para la culminación de la diferenciación de los bacteroides a su forma madura fijadora de nitrógeno. En ausencia de B (-B, derecha), la inestabilidad de las glicoproteínas-RGII de membrana, imposibilitaría la interacción con PsNLEC 1 con la consiguiente pérdida en la fusión vesicular y el fallo en el desarrollo de los bacteroides. (V) vesículas del Golgi; (MPB) membrana prebacterioide; (LPS) lipopolisacárido bacteriano; (GP) glicoproteínas de membrana; (MV) membrana vesicular; (cv) contenido vesicular

Todos estos efectos se traducen en el fallo en la organogénesis en ausencia de B (Fig.58). En concreto, en el nódulo control (Fig.17 E y 55 A), se puede diferenciar una zona con un meristemo apical permanente junto con una zona central con células diferenciadas, muchas de ellas invadidas por el rizobio y otras no invadidas, conformando la zona intersticial que comunicaría la zona central con el tejido vascular. La estructura se completaría con la existencia del córtex del nódulo bien diferenciado. Por el contrario, en nódulos deficientes (Fig.20 F y 58 B) no existiría un claro desarrollo de los tejidos nodulares, y aparecería una proliferación celular sin la apropiada diferenciación, dando lugar a un estructura tipo tumoral.

Lo descrito para nódulos indeterminados, pese a la diferencia en la ontogenia, también se extendería a nódulos determinados, en este caso de judía (Fig.21 y 58 C y D), en los que la deficiencia conformaría una estructura semejante a un tejido tumoral.

Así, la deficiencia de B tiene un importante efecto sobre componentes involucrados en la interacción molecular y celular planta-bacteria durante el desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa. Estas interacciones son determinantes del proceso de organogénesis. Por ello, es lógico pensar que el efecto de la deficiencia de B en la nodulación, con la formación de órganos aberrantes similares a estructuras tumorales (Fig.58), vaya acompañado de una alteración en la regulación del ciclo celular. Los nódulos desarrollados en ausencia de B presentan, respecto a los control, un reducido tamaño (Fig.20 y 21) que se ha demostrado consecuencia no de la reducción del número de células (por el cese de la actividad mitótica), sino del fallo en el incremento del tamaño celular debido a una pérdida en la expresión del gen *ccs52a* (Reguera y col., 2009), implicado en la detención de la actividad mitótica celular y de provocar la transición a ciclos de endoreduplicación, responsables del aumento del tamaño celular (Cebolla y col., 1999). Concretamente, este gen se describe como un activador del complejo promotor de la anafase (Anaphase Promoting Complex), complejo encargado de la poliubiquitinización de ciclinas B mitóticas, resultando en la inactivación de CDKs (ciclinas dependientes de quinasas) antes de la mitosis (Kondorosi y col., 2005), cuya expresión también es necesaria para el inicio del programa de diferenciación celular (Vinardell y col., 2003)

Con esto, se pone en evidencia que el B es un micronutriente especialmente requerido en etapas iniciales de organogénesis, no para mantener la actividad mitótica en meristemas, sino como responsable de desencadenar fenómenos de diferenciación, gracias a la activación de genes como *ccs52a*, posiblemente gracias a la mediación en la interacción entre la bacteria y glicoproteínas de la membrana de la célula vegetal, desencadenando fenómenos de endoreduplicación previos a la endocitosis del rizobio.

De manera similar a lo que ocurre en la simbiosis rizobio-leguminosa, en el desarrollo embrionario animal existen alteraciones ocasionadas por la deficiencia de B, que dan lugar a un fallo en el proceso organogénico (Rowe y Eckhert, 1999; Fort y col., 1999). En los trabajos llevados a cabo tanto en pez cebra como en *Xenopus* (Rowe y Eckhert,

1999; Fort y col., 1999), se describe cómo la ausencia nutricional de B provoca efectos a nivel de desarrollo embrionario afectando al fenómeno de segmentación, blastulación, gastrulación, y conduciendo a un fallo en la organogénesis de estómago, región craneofacial, ojos y cola. Sin embargo, estos estudios se basaron en el mantenimiento nutricional pobre en B de las hembras, por lo que los efectos descritos como consecuencia de la deficiencia de B en embriogénesis podrían ser secundarios, derivados del desarrollo anómalo de oocitos en dichas hembras, efecto que describieron Fort y col. (2002) para *Xenopus*, y por tanto, no deberse a efectos directos del B sobre el desarrollo embrionario.

Los ensayos con pez cebra realizados en el presente trabajo, en cambio, se basaron en la inducción de deficiencia de B en distintos momentos del desarrollo embrionario con el fin de localizar “ventanas” de acción del micronutriente. Así, como se reflejó anteriormente en el apartado de resultados, se observó que independientemente del momento en el que el embrión fuera transferido a medio libre de B, se producía una alteración del corion del huevo (Fig.61), sugiriendo un papel estructural del micronutriente similar al de la estabilización de pectinas en paredes celulares vegetales (O’Nelly y col., 2004), de glicolípidos en las cubiertas de los heterocistos de cianobacterias (García-González y col., 1991) o de hopanoides en las cubiertas de *Frankia*. De hecho, la estructura del corion está caracterizada por tener tres láminas muy ricas en cuatro polipéptidos, dos de ellos glicosilados y con posible actividad lectina (Bonsignorio y col., 1996). Por tanto, es posible que estas glicoproteínas con carácter estructural sean susceptibles de ser estabilizadas por puentes borato di-éster, cuya ausencia podría ser la responsable de esta alteración, hipótesis que tendrá que ser investigada con mayor profundidad en futuros trabajos. No obstante, esta alteración del corion no parece tener efectos significativos sobre el desarrollo del embrión, ya que, en ventanas de desarrollo no afectadas por deficiencia de B, esto ocurría normalmente y las larvas eran viables aunque existiese una alteración estructural del corion.

Además, se ha demostrado que durante todos los estados del desarrollo del pez cebra, desde huevos fertilizados hasta la eclosión, se sintetizan diferentes tipos de glicanos característicos de distintos momentos del desarrollo (Guérardel y col., 2005) que podrían justificar un papel del B en dicho proceso. Entrando, por tanto, en los efectos del B sobre el desarrollo embrionario y organogénesis del pez cebra, cuando el embrión

era traspasado a un medio deficiente de forma inmediata a la fecundación, en un estadio de división celular inicial y de no más de 8 células (antes de 1,5 h post-fecundación), la mayoría de los embriones abortaba (en un 75-85%) apareciendo una masa celular indiferenciada (Fig.62) denotando una afección en el proceso de segregación del blastodisco hacia el polo animal y en el inicio de la segmentación. Teniendo en cuenta que este momento coincide con el inicio de un fenómeno de rápidas divisiones, la generación de una masa celular indiferenciada podría tener relación con una alteración en el ciclo celular por fallo en la diferenciación celular al igual que hemos descrito para nódulos de leguminosas (Reguera y col., 2009). En relación a esto, estudios realizados en cultivos celulares de cáncer de próstata y pecho, muestran que la adición de bórico parece tener un efecto ralentizador de la proliferación celular (Meacham y col., 2007), lo que podría estar relacionado con la inhibición por adición de B del efecto mitogénico de la deficiencia, mediado por MAPK. También, como se ha descrito, el hecho de que el B pueda unirse al  $\text{NAD}^+$ , afectando a la producción de  $\text{ADPR}_C$  y por tanto, a la liberación de calcio endógeno (Eckhert y col., 2007, Barranco y col., 2008), deteniendo la proliferación de células tumorales de próstata, explicaría también que, en ausencia del micronutriente el proceso de proliferación celular se descontrolara, dando lugar a un desarrollo embrionario de aspecto “tumoral”, como el descrito.

Si el embrión era traspasado algo más tarde, 2,5 h post-fecundación, a un medio sin B, momento coincidente con el proceso de segmentación, en un estadio de 256 células o superior, cuando ya se ha disparado el programa de diferenciación celular, los embriones llegaban a desarrollarse normalmente y los huevos llegaban a eclosionar.

Estas etapas tempranas del desarrollo vienen caracterizadas por la síntesis intensa de glicoproteínas tipo mucina con un patrón de O-glicosilación muy característico, basado en la estructura básica  $\text{Fuc}_1\text{-3GalNAc}_1\text{-4(Neu5Ac/Neu5Gc}_2\text{-3)Gal}_1\text{-3GalNAc}$  que posteriormente se va enriqueciendo de ácido siálico coincidiendo con el inicio de la segmentación (Guérardel y col., 2005). El ácido siálico (derivado del neuramínico) es el monosacárido terminal más abundante en los glicoconjugados de la superficie de las células eucariotas (Traving y Schauer, 1998) y está implicado en una gran variedad de funciones celulares, relacionadas con la interacción célula-célula en procesos de reconocimiento, tales como metástasis y progresión de algunos tumores (Kageshita y col., 1995), infección de virus y estabilidad de otras glicoproteínas (Varki, 1997) y

desarrollo embrionario temprano de mamíferos (Schwarzkopf y col. 2002). Su estructura contiene grupos diol susceptibles de interaccionar con B, por lo que sería interesante estudiar si existe relación entre los efectos de la deficiencia de B y la sialilación de esta mucina característica de esta etapa temprana del desarrollo.

Además de este efecto temprano de la deficiencia de B, tanto en los embriones que sobrevivieron a este tratamiento –B muy temprano como en aquellos no afectados cuando se indujo la deficiencia en momentos más tardíos, aproximadamente 72 horas tras la fecundación, se observaba un fallo en la organogénesis de aletas, boca o en el aparato circulatorio (Fig.63 E). Con este resultado, y teniendo en cuenta que el desarrollo de estos órganos ocurre entre las 60 y las 70 horas después de la fecundación coincide con una intensa síntesis y tráfico de glicanos a las membranas celulares en los puntos de organogénesis de los mismos, de acuerdo a lo publicado por Laughlin y col. (2008), se realizaron ensayos transfiriendo los embriones a un medio deficiente de B a las 53 horas de desarrollo, observándose que, pocas horas después (entre 70 y 72 horas post-fecundación), ocurrían los mismos efectos sobre la organogénesis, incluso de forma más acusada (Fig.63 F y G). Esto nos llevó a determinar que, además de en las etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, existía un elevado requerimiento de B en un momento determinado de la organogénesis, en el que además, existía una elevada síntesis de glicanos y un intenso tráfico de membranas (Laughlin y col., 2008), apoyando así el modelo propuesto sobre el posible papel del B en el tráfico y fusión vesicular (Goldbach, 1997), aunque sin duda, confirmar la extensión del modelo requiere de un análisis más profundo.

Uno de los efectos más drásticos observados bajo deficiencia, inducida tanto 2,5 h o 53 h después de la fecundación, fue una elevada fotosensibilidad de las larvas, lo que se correlacionaba con el desarrollo anómalo de los órganos oculares, junto con una elevada fotosensibilidad. Estas alteraciones ya habían sido descritas en los trabajos citados tanto en el pez cebra como en *Xenopus* (Rowe y Eckhert, 1999; Fort y col., 1999).

En cualquier caso, aunque ninguna de estas larvas sobrevivió más allá de 96 h, para avanzar algo más en el estudio, se decidió estudiar el perfil proteico de aquellos organismos supervivientes a la eclosión (Fig.64), bien crecidos en ausencia de B en estadio de segmentación o bien en aquellos donde se había inducido la deficiencia 53



horas después de la fecundación. En dicho perfil se observaron diferencias acusadas entre el control (calles 1 y 4) y los desarrollados bajo deficiencia (calles 2 y 3), destacando la inducción de una serie de proteínas en estos últimos. Además, aunque en menor medida, también se observaron diferencias en el patrón proteico entre los dos momentos de inducción de la deficiencia. Con el fin de afinar en la búsqueda de componentes que pudieran dar sentido al papel del B en la organogénesis animal, se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas MALDI TOF de las proteínas inducidas bajo deficiencia del micronutriente, recogidas en la tabla 19. Se analizaron hasta 13 bandas, de las cuales se pudieron identificar 9. Las bandas 1, 2 y 10, correspondieron a la misma proteína, una miosina tipo 2, relacionada con la contracción en el movimiento celular al ser un componente integrante del músculo liso y esquelético. Esta proteína posee un dominio con actividad ATPasa y pertenece al grupo de “P-loop NTPasa”. Precisamente, la inducción de estas proteínas se podría relacionar con alteraciones del patrón de polimerización del citoesqueleto y la inducción de la tubulina y actina descrito en plantas, concretamente en células de maíz como respuesta a la deficiencia de B (Yu y col., 2003). Otra de las bandas identificadas, correspondió a una aconitasa 2 mitocondrial, que cataliza la isomerización del citrato a isocitrato como paso integrante del ciclo de Krebs. Incluidas en la banda 3, se identificaron dos proteínas coincidentes en tamaño. Por un lado, la enolasa 3, que constituye una enzima que participa en la catálisis reversible de la deshidratación del 2-fosfo-D-glicerato al fosfoenolpiruvato dentro de la ruta glicolítica-glucogenogénesis. Por el otro, el factor  $1\alpha$  de elongación (EF1 $\alpha$ ) en eucariotas, que se encarga del anclaje dependiente de GTP del amioacil-ARNt a los ribosomas, cuya inducción podría tener que ver con la interacción del B con la molécula de GTP, que posee una composición y estructura (9- $\beta$ -D-ribofuranosil-2-amino-6-oxo-purina-5'-trifosfato), que le haría susceptible de interaccionar con B de manera similar a lo que ocurre con el furanosil diéster borato presente en el autoinductor AI2 del *quorum-sensing* bacteriano (Cheng y col., 2002). Por otro lado, la inducción del factor de elongación  $1\alpha$  en condiciones de deficiencia, podría constituir una respuesta a la alteración en la traducción o en la estabilidad de otras proteínas, para compensar su síntesis. De hecho, en condiciones de deficiencia, parece existir una inducción en la expresión de gran número de genes achacada a la desestabilización del producto final (la proteína) (Redondo-Nieto, 2002; Bonilla y col., 2006). Por otro lado, los niveles de expresión de muchos de estos genes parecen

recuperarse por adición de calcio (Redondo-Nieto, 2002) dando sentido al posible efecto secundario y no primario de la deficiencia por la relación B-Ca.

La banda 10 correspondió a una aldolasa 1 fructosa-bifosfato, que se encarga de catalizar la escisión de la fructosa-1,6-bifosfato en 3-fosfato gliceraldehído y en fosfato dihidroxiacetona (DHAP), cuya inducción, junto con la de la enolasa 3 y la de la aconitasa, revelan la posible implicación del B en el metabolismo de carbohidratos, efecto que en plantas ya fue señalado y que se recoge en la introducción. Por otro lado, la banda número 11 correspondió a una proteína de choque térmico (en inglés, *Heat Shock Protein*) (70 kDa), regulada por glucosa. Esta proteína constituye una chaperona, que como tal, está involucrada en el plegamiento de otras proteínas bien recién sintetizadas o que atraviesan la membrana o aquellas que han sido desnaturalizadas, además de participar en su ensamblaje y transporte. Precisamente se ha relacionado su acción con la protección celular ante distintos estreses. Esta proteína parece ejercer una importante función en la protección inhibiendo la apoptosis celular debida a estrés (Mosser y col., 1997) y se ha vinculado a la respuesta inmune. Existen estudios que relacionan la inducción del gen *hsp70* con la existencia de condiciones de estrés en ciertos tejidos durante el desarrollo del pez cebra (Lele y col., 1997), además, la síntesis de una HSP70 se ha vinculado con el desarrollo de la lente ocular durante la embriogénesis de dicho animal (Krone y col., 2003).

Otras proteínas inducidas en deficiencia, aunque con un *score* y una cobertura de secuencia bajos, y por ello, con una identificación menos fiable, fueron la banda 12, que correspondía a una syntaxina 1 b, implicada en procesos de secreción (Bennet y col., 1993) que a su vez coincidió en tamaño con una deshidrogenasa láctica D4 y una hipotética LOC406405, y la banda 13, en la que aparecieron una ATPsintasa, una hipotética LOC541344 y una hipotética proteína beta cristalina 1b, cuyo gen codificante se ha relacionado con la formación de órganos oculares (Wang y col., 2008).

La syntaxina 1b, es una glicoproteína particularmente importante para el sistema nervioso. Constituyen una familia de receptores unidos a la membrana presináptica e implicados en el transporte intracelular de vesículas sinápticas (Hicks y col., 1997), lo que la relacionaría con el modelo propuesto de acuerdo con nuestros resultados para el

papel del B en la fusión vesicular durante procesos de desarrollo. La deshidrogenasa láctica D4 pertenece a la familia de deshidrogenasas 2-hidroxicarboxilato NAD-dependientes, y se encargan de catalizar el último paso de la glicolisis en donde el piruvato es convertido a L-lactato.

En el caso de la proteína hipotética LOC406405 (banda 12) constituiría una enzima MDH (de las malato deshidrogenasas), implicada en el Ciclo de Krebs, en la conversión del malato a oxoacetato. Parece estar incluida dentro de la familia de proteínas hidroxicarboxilato dependientes de NAD.

La proteína hipotética LOC541344 correspondería a una proteína incluida en la familia de las peroxiredoxinas (PRX), antioxidantes que confieren un efecto protector a la célula gracias a su actividad peroxidasa.

La baja fiabilidad en la identificación de estas proteínas, junto con el hecho de presentarse varias proteínas en la misma banda, impide determinar de forma fiable cuál de ellas o si todas son inducidas bajo deficiencia de B. Por ello, para ir más allá del puro análisis descriptivo, se han de llevar a cabo estudios proteómicos más precisos, con una segunda dimensión, así como de localización subcelular complementándolos con la determinación de expresión génica, especialmente sobre algunas de ellas, como la syntaxina o la beta cristalina 1b, por su importancia para el desarrollo y organogénesis y porque podrían explicar, en parte, alguna de las anomalías descritas.

Se ha de tener en cuenta que todas las proteínas identificadas e inducidas bajo deficiencia de B en el pez cebra se presentan en mamíferos, incluido en humanos, lo que apoya la idea de que el estudio de la funcionalidad del B en el desarrollo del pez cebra constituye un buen modelo para determinar el papel que juega el B en animales.

Por otro lado, es necesario considerar que la determinación del efecto primario del B para cada una de las funciones que pueden relacionarse con las proteínas inducidas bajo deficiencia, requeriría de un estudio pormenorizado al respecto, más allá de lo realizado en el presente trabajo.

Finalmente, podemos establecer que prácticamente todos los resultados presentados en nuestro estudio apoyarían la idea de que la funcionalidad del B se extiende más allá de

las paredes y cubiertas celulares, y abren nuevas expectativas y nuevas posibilidades experimentales para analizar el papel/papeles que el B puede desempeñar en los sistemas biológicos.

Se ha de tener en cuenta, no obstante, que una dificultad añadida en el estudio de la deficiencia de B y sus efectos en procesos de desarrollo embrionario y organogénesis es que parte de éstos pueden ser una consecuencia indirecta o secundaria de la alteración del metabolismo de otros nutrientes o moléculas implicadas en la transducción de señales celulares. Tal es el caso de la relación mantenida entre el B y el Ca, descrita en numerosos trabajos (Bonilla y col., 1995; Carpena y col., 2000; Redondo-Nieto y col., 2003), en los que se establece que los niveles de ambos se mantienen en una estrecha relación, y que parte de las alteraciones causadas por la deficiencia de uno pueden ser compensadas por la adición del otro, tal y como ocurre en la simbiosis rizobio-leguminosa, y como probablemente pueda estar ocurriendo en el desarrollo del pez cebra, quizás relacionado con el efecto del B sobre la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  por su incidencia sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno mediada por ADPRc (Barranco y col., 2008). De hecho, en la simbiosis de leguminosas, los niveles de expresión de muchos de los genes afectados por deficiencia de B parecen recuperarse por adición de calcio (Redondo-Nieto, 2002) dando sentido a un posible efecto secundario y no primario de la deficiencia de B, por incidencia sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero. No obstante, en el desarrollo del proceso simbiótico bajo deficiencia de B se ha demostrado que la diferenciación y maduración de simbiosomas, las modificaciones en la expresión de determinados genes o las alteraciones estructurales de pared, no se han recuperado por adición de suplementos de Ca, si bien, procesos tempranos de la simbiosis, como la invasión, se han mostrado ciertamente recuperados tras su adición (Bonilla y col., 2006; Redondo-Nieto, 2002). Por ello, de cara a establecer definitivamente el papel del B en procesos de desarrollo y organogénesis ha de abordarse la determinación clara de los efectos primarios causados por la deficiencia de B, como puede ser la estabilización de glicoproteínas de membrana según hemos descrito en este trabajo, para discernirlos de los secundarios.

## ***CONCLUSIONES***

---



## CONCLUSIONES

- 1) La deficiencia de B en la simbiosis rizobio-leguminosa conduce a la generación de nódulos no funcionales, que presentan una característica alteración del desarrollo, mostrando un aspecto aparente de necrosis prematura que denota su inactividad. En ellos no se produce una diferenciación clara de los tejidos nodulares y se observa una desorganización estructural generalizada del órgano.
- 2) De acuerdo con los resultados obtenidos, la metodología aplicada para la captación de ligandos de B utilizando la resina Amberlita IRA-743, parece una técnica factible en la búsqueda de componentes potencialmente asociados al micronutriente, a partir de los cuales se podrá analizar la funcionalidad del B en seres vivos. No obstante, en las condiciones ensayadas, esta técnica tiene la limitación de aparecer restringida a la captación de monoésteres, pero no de diésteres borato, y la sensibilidad requiere aparentemente una cantidad grande de potenciales ligandos, por lo que glicanos de membranas, cuya extracción es menor, o potenciales ligandos que se encuentren en pequeña concentración en las células, serán difíciles de detectar a menos que se consigan obtener extractos con suficiente cantidad de los mismos. Aún con estas limitaciones, la glicoproteína de la familia de extensinas específicas de leguminosas AGPE, la pectina rhamnogalacturonano II (RGII) y el transportador de oxígeno leghemoglobina, han sido detectados como potenciales ligandos de B por su asociación a la Amberlita.
- 3) La asociación de la glicoproteína AGPE con la pectina RGII, parece indispensable para el crecimiento polarizado del canal de infección, en una interacción implicando a ambos componentes que podría estar mediada por B, y que además de ser determinante del crecimiento del canal, condicionaría la progresión bacteriana a través del mismo, ya que la presencia de B inhibe la adherencia de la AGPE a la superficie de la bacteria, que, en deficiencia de B, quedaría “atrapada” en el interior del canal y sufriría una posterior degradación.

- 4) En relación al punto anterior, la asociación que implica a AGPE, boro y RGII parece necesaria para el mantenimiento estructural de la barrera de difusión de oxígeno del nódulo, ya que la glicoproteína no sella los espacios intercelulares del córtex en nódulos deficientes de B, provocando un exceso de oxígeno en el interior del mismo, condicionando su funcionalidad al ser determinante de la inhibición de la actividad nitrogenasa.
- 5) Además de la alteración de la barrera de oxígeno, la leghemoglobina, que se detectó como potencial ligando de B, aparece inestable en nódulos deficientes, desapareciendo de los mismos tras dos semanas de desarrollo. Aunque su nivel de expresión génica disminuyó en dichos nódulos con el tiempo, indicando una alteración transcripcional, no explicó la desaparición total de la proteína en deficiencia de B, denotando un posible fallo a nivel traduccional y/o en la estabilidad post-traducciona de la proteína. La relación de dicha alteración con la posible asociación de la Lb al B, si existe, está por determinar.
- 6) La ausencia, en bacterias aisladas de nódulos deficientes en B, de un antígeno del LPS característico de bacteroides o bacterias crecidas en microaerobiosis, sugiere que, efectivamente, a la vista del fallo en los dos principales mecanismos de regulación de la concentración de oxígeno, su nivel es elevado en el interior de nódulos deficientes en B, lo que sería suficiente para explicar la no funcionalidad de los mismos. Sin embargo, a pesar de ello, y de acuerdo con los resultados obtenidos, la valoración del daño oxidativo a lípidos y proteínas, y la determinación de la actividad del sistema antioxidante APX, sugieren que no existe un daño oxidativo en nódulos desarrollados bajo deficiencia de B, a pesar de existir una alteración en la barrera de difusión de oxígeno, seguramente por ausencia de los dos principales mecanismos generadores de especies reactivas de oxígeno, como son la leghemoglobina y una elevada tasa respiratoria de bacteroides, que tampoco puede existir en estos nódulos al estar pobremente invadidos.
- 7) Por otro lado, el estudio comparativo de los perfiles proteicos de muestras control y deficientes, reveló la existencia de una inducción de proteínas relacionadas con patogénesis bajo deficiencia de B. Aunque su análisis no ha permitido descartar que parte de esta inducción se deba a la acción de un estrés



de carácter abiótico, a nivel nutricional, su alto nivel de expresión en etapas tempranas de la nodulación en deficiencia de B, sugiere una inducción en respuesta a un estrés biótico, por un fallo en el reconocimiento del rizobio bajo deficiencia de B. Además, los resultados y análisis llevados a cabo en el presente trabajo, denotan la aparición de respuestas típicas de defensa por parte de la planta, que parecen prepararla ante el posible ataque o presencia de patógenos, y que parecen conducir a la necrosis prematura de las células del nódulo así como de las bacterias que han logrado invadirlo en deficiencia de B.

- 8) La alteración de la organogénesis del nódulo observada bajo deficiencia de B, que conduce al desarrollo de estructuras de aspecto “tumoral”, podría tener explicación en el modelo propuesto sobre el papel que juega el B en la estabilización de glicoproteínas de membrana, como las reconocidas por anti-RGII, y que no se detectaron en deficiencia de B. Estas glicoproteínas podrían estar implicadas en procesos de señalización celular o/y en la estabilidad de los mecanismos que posibilitarían la fusión vesicular, imprescindible para la maduración de simbiosomas, que aborta en ausencia del micronutriente, y en general, para los procesos de secreción durante el proceso organogénico del nódulo.
- 9) El estudio de los efectos de la deficiencia de B sobre el desarrollo embrionario del pez cebra, indican que este es un buen modelo biológico para abordar experimentalmente el papel del B sobre el desarrollo animal, pues los resultados obtenidos mostraron que este nutriente es especialmente requerido en ciertas etapas del proceso. Concretamente, mostraron una elevada sensibilidad a la deficiencia de B, las etapas de segregación del blastodisco y de segmentación, caracterizadas por un patrón de glicosilación característico, cuya estabilidad en deficiencia de B resultará muy interesante analizar, y el momento previo a la organogénesis en larvas de aletas, mandíbulas y órganos sensoriales, que acontece 60-70 horas post-fecundación, y que coincide también con una intensa síntesis de glicanos de membrana, que lleva a pensar en la posible implicación del B en su estabilidad, ejerciendo un papel similar al propuesto para la organogénesis del nódulo.

De manera generalizada, se podría afirmar como conclusión final que, a la vista de los resultados obtenidos, el papel del B en los seres vivos va más allá de su acción en la estabilización de las paredes y cubiertas celulares, tal y como revela su implicación en procesos mediados por células desprovistas de cubiertas, como es el caso del desarrollo embrionario animal, y los efectos observados sobre componentes implicados en las interacciones planta-microorganismo en el sistema simbiótico rizobio-leguminosa y en la organogénesis de los nódulos resultantes de esta simbiosis. Pese a ello, dadas las limitaciones analíticas con las que aún se cuenta, y que son determinantes del estudio de la función del B en sistemas vivos, resulta arduo complicado el discernir si los efectos causados por la deficiencia del nutriente, sobre todo en los procesos de organogénesis, constituyen una acción directa del mismo o bien se deben a efectos secundarios por su relación con otros constituyentes de los procesos de señalización celular, como el  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ello, cabe destacar la importancia de profundizar en su estudio para dilucidar las acciones y las consecuencias de su presencia o ausencia en organismos vivos, con el objetivo global de ampliar los conocimientos básicos sobre el desarrollo animal y vegetal, y mejorar distintos aspectos que van desde el incremento de la productividad agrícola en cultivos, hasta la determinación de su funcionalidad en animales, y su posible aplicación en la terapia contra distintas enfermedades como se ha visto en algunos tipos de cáncer.

## *Conclusions*

---



## CONCLUSIONS

- 1) Boron deficiency during Legume-*Rhizobium* symbiosis leads to formation of non-functional nodules which develop aberrantly, showing an apparent aspect of premature necrosis. Moreover, there is no clear tissue differentiation and an structural widespread disorganization of the organ is observed.
- 2) According to the obtained results, the methodology applied to capture B-ligands, based on the use of Amberlite IRA-743, seems to be a feasible technique in the search of components potentially associated with the essential micronutrient, from which boron functionality in organisms can be analyzed. However, under the tested conditions, this technique has the limitation of being restricted to capture monoesters but not diester-borate complexes, and the sensitivity seems to be low so that a large amount of potential ligands are needed for detection; therefore membranes glycans, which extraction is poor, or other potential ligands that appear in small concentration in cells, are difficult to detect unless they are obtained in enough quantity. Nevertheless, even with these limitations, the member of legume specific extensin glycoprotein AGPE, the pectin rhamnogalacturonan II (RGII), and the oxygen carrier leghemoglobin have been identified as potential ligands of B through its association with Amberlite.
- 3) An association involving the glycoprotein AGPE and the pectin RGII seems to be essential for a polarized growth of the infection thread. This interaction between plant components could be mediated by B, which is not only a determinant of the infection thread growth but also determines the bacterial progression inside the infection thread lumen, because the presence of B inhibits the adhesion of the AGPE to the bacterial surface, which otherwise would be "trapped" inside the matrix under B deficiency and would suffer further degradation.
- 4) In relation to the previous point, the association involving AGPE, B, and RGII seems to be also necessary for the structural maintenance of the nodule oxygen diffusion barrier because the glycoprotein does not seal the intercellular spaces of the cortex in B-deficient nodules. This generates a oxygen diffusion to the

inner tissues of the nodule, which is determinant for the inhibition of nitrogenase activity.

- 5) Besides the alteration of the oxygen barrier, the leghemoglobin, which was detected as a potential boron ligand, appears unstable in B-deficient nodules, disappearing after two weeks of development. Although its gene expression level decreased along the time in B-deficient nodules, this reduction was not enough to explain the total disappearance of the protein, indicating a possible failure at a translational or post-translational level. The relation of this alteration with the possible association of Lb to B needs to be further analyzed.
- 6) The absence in bacteroids isolated from B-deficient nodules of an epitope on the LPS, typically expressed in bacteroids or free-living bacteria grown in microaerobiosis conditions, suggests that the failure of the two main mechanisms of oxygen regulation leads to high oxygen level inside nodules deprived of B that could be enough to explain the lost of nodule functionality. However, despite this, and according to the results, the estimation of oxidative damage to lipids and proteins and measurement of the antioxidant system APX suggest that there is no oxidative damage in nodules developed under B-deficiency,
- 7) The comparative study of protein profiles from control and B-deficient nodules, revealed the existence of pathogenesis-related protein induction under boron deficiency. Our study did not completely discard that at least part of this induction is due to an abiotic stress at a nutritional level; nevertheless, the high expression level in early stages of nodulation suggests that the main responsible is a biotic stress, likely due to a failure in the plant recognition of the microorganism under B-deficiency. Furthermore, the results and analysis carried out in this work reflect the occurrence of plant defense-like responses which seem to prepare the plant to the presence of potential pathogens, and which appear to lead to premature necrosis of nodule host and bacteria cells.
- 8) The alteration of nodule organogenesis observed under B deficiency, which leads to the development of tumor-like structures, could be explained through the proposed model of a boron role in the stability of membrane glycoproteins, as those recognized by anti-RGII, which were never detected in nodules developed under B-deficiency. These glycoproteins could be involved in cell signaling processes and/or in the stability of the mechanisms of vesicular

merging, which are essential for symbiosome maturation and cell growth, and that fails in the absence of the micronutrient affecting the nodule organogenetic process.

- 9) The study of the effects of B-deficiency on embryo development of zebrafish, indicate that this is a good biological model to study the role of B in animals, because the results show that the nutrient is especially required at certain stages of the process. Particularly, during early embryogenesis the cleavage and blastula periods are highly sensitive to B deficiency. Both of them are characterized by a distinctive pattern of glycosylation. At later stages, B is also heavily required at the moments prior to the organogenesis process of larval fins, jaws, and sensory organs, which occur between 60-70 hours post-fertilization, and that also coincides with an intense synthesis of membrane glycans. This supports that the involvement of B in animal organogenesis can also be related to glycan stability.

As an overall conclusion in view of the results, it could be stated that the biological role of B goes beyond the cell wall as shown for animal embryo development and demonstrated the observed effects of B-deficiency on components involved in plant-microorganism interactions during the symbiosis rhizobia-legume. Nevertheless, it has to be stated that, due to the known limitations of analytical techniques and procedures, it is sometimes hard to discern whether the effects caused by deficiency of the nutrient, especially on processes of organogenesis, are a consequence of a direct action of B or appear as secondary effects due to a relationship of the micronutrient with other molecules or components involved in cell signaling perception and transduction pathways, such as  $\text{Ca}^{2+}$ . Therefore, it is imperative further analysis to elucidate the actions and the consequences of the boron presence or absence in organisms, with the overall objective of expanding basic knowledge on animal and plant development, and improving several applied aspects ranging from increase of productivity in agricultural crops to determine B functions in animals and human, with the aim of help developing therapies against various diseases, as some types of cancer.





## ***BIBLIOGRAFÍA***

---



**Agulhon H. (1910)** Présence et utilité du bore chez les végétaux. *Annales De L'institut Pasteur*, **24**: 321-329.

**Albert L. S. (1965)**. Ribonucleic Acid Content, Boron Deficiency Symptoms, and Elongation of Tomato Root Tips. *Plant Physiol.* **40(4)**: 649–652.

**Albus U., Baier R., Holst O., Puhler A. y Niehaus K. (2001)**. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytologist* **151**: 597–606.

**Alesandrini F., Mathis R., Van de Sype G., Herouart D., Puppo A. (2003)**. Possible roles of a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. *New Phytologist* **158**: 131–138.

**Amor B. B., Shaw S. L., Oldroyd G. E. D., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S. R., Denarie J., y Gough C. (2003)**. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* **34**: 495–506.

**Ardourel M., Demont N., Debellé F., Maillet F., de Billy F., Promé J. C., Dénarié J., Truchet G. (1994)**. Rhizobium meliloti lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell.* **6(10)**:1357-74.

**Armstrong T. A., Flowers W. L., Spears J. W. y Nielsen F. H. (2002)**. Long-term effects of boron supplementation on reproductive characteristics and bone mechanical properties in gilts *Journal of Animal Science*, **80(1)**; 154-161.

**Armstrong, T. A., Spears, J. W., Crenshaw, T. D., Nielsen, F. H. (2000)**: Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. *J. Nutr.* **130**, 2575–2581.

**Asad A., Bell R.W. y Huang L. (1997)** Development of a boron buffered solution culture system for controlled studies of plant boron nutrition. *Plant and Soil* **188**: 21–32.

**Aslam S. N., Newman M.-A., Erbs G., Morrissey K.L., Chinchilla D., Boller T. (2008)**. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* **18**: 1078–1083.

- Baghour M., Moreno D., Villora G., Hernández, J. Castilla N., Romero L. (2002).** The influence of the root zone temperatures on the phytoextraction boron and aluminium with potato plant growing in the field. *J. Environ. Sci. Health Part A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **37(5)**: 939-953.
- Bai Y. S., Hunt C. D. (1996).** Dietary boron enhances efficacy of cholecalciferol in broiler chicks. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **9**:117–132.
- Bakken N. A., Hunt C. D. (2003).** Dietary boron decreases peak pancreatic in situ insulin release in chicks and plasma insulin concentrations in rats regardless of vitamin D or magnesium status. *J. Nutr.* **133**: 3577–3583.
- Banba M., Siddique A-B. M., Kouchi H., Izui K., Hata S. (2001).** Lotus japonicus forms early senescent root nodules with *Rhizobium etli*. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 173–180.
- Barr R., Böttger M., Crane F. L. (1993).** The effect of boron on plasma membrane electron transport and associated proton secretion by cultured carrot cells. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **31**:31–39.
- Barranco W. T., Hudak P. F., Eckhert C. D. (2007).** Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes and Control*, 2007. Springer 18(1):71-77.
- Barth R. F., Soloway A. H., Brugger R. M. (1996).** Boron neutron capture therapy of brain tumors: past history, current status, and future potential. *Cancer Invest.* **14(6)**:534-50.
- Barratt D. H. P., Whitford P. N., Cook S. K., Butcher G. y Wang T. L. (1989).** An analysis of seed development in *Pisum sativum*. VIII. Does abscisic acid prevent precocious germination and control storageprotein synthesis?. *Journal of Experimental Botany.* **40**:1009-1014.
- Barut B. A., Zon L. I. (2000).** Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease. *Physiol Genomics.* **2**:49-51.
- Bassil E., Hu H.N. & Brown P.H. (2004).** Use of phenylboronic acids to investigate boron functions in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell to wall adhesion. *Plant Physiology* **136**: 3383-3395.

- Bauer W. D. y Mathesius U. (2004).** Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol.* **7**:429–433.
- Becana M., Dalton D. A., Moran J. F., Iturbe-Ormaetxe Iñaki, Matamoros M. A. y Rubio M C.. (2000).** Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum* **109(4)**:372 – 3811.
- Becana, M. y Klucas, R. V. (1992a).** Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. *Plant Physiol.* **98**:1217-1221.
- Becana M., Klucas R.V. (1992b).** Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 8958–8962.
- Becquart-de-Kozak I., Reuhs B. L., Buffard D., Breda C., Kim J. S., Esnault R. y Kondorosi A. (1997).** Role of the K-antigen sub-group of capsular polysaccharide in the early recognition process between *Rhizobium meliloti* and alfalfa leaves. *Mol Plant-Microbe Interact.* **10**: 114–123.
- Benhamou N., Lafontaine P. J., Mazau D., Esquerré-Tugayé M. T. (1991).** Differential accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in bean root nodule cells infected with a wild-type strain or a C4-dicarboxylic acid mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Planta* **184**: 457-467.
- Bennett A., Rowe R. I., Soch N. y Eckhert C. D. (1999).** Boron Stimulates Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Growth Journal of Nutrition.* **129**: 2236-2238.
- Bennett M. K., Garcia-Arrarás J. E., Elferink L. A., Peterson K., Fleming A. M., Hazuka C. D. y Scheller R.H. (1993).** The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell.* **74(5)**:863-873.
- Bell R. W, Dell B., Huang L. (2002).** Boron requirements of plants. En: Goldbach, H. E., et al.: Boron in plant and animal nutrition. *Kluwer Academic/Plenum Publ.* 63-100.
- Bergmann H., Preddle E.y Verma D. P. S. (1983).** Nodulin-35: A subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2**:2333-2339.

- Bhagwat A. A., Mithofer A., Pfeffer P. E., Kraus C., Spickers N., Hotchkiss A., Ebel J. y Keister D.L. (1999).** Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodekakis-(1,3)-betaglucosyl. *Plant Physiol.* **119**:1057–1064.
- Biesiadka J, Bujacz G, Sikorski MM, Jaskolski M. (2002).** Crystal Structures of Two Homologous Pathogenesis-related Proteins from Yellow Lupine. *J Mol Biol.* 2002;319:1223–1234.
- Birnbaum E. H., Dugger W. M., y Beasley B. C. A. (1977).** Interaction of Boron with Components of Nucleic Acid Metabolism in Cotton Ovules Cultured in vitro. *Plant Physiol.* **59**:1034-1038.
- Bisseling T., Bos R.C. van den, Weststrate M. W., Hakkaart M. J. J., Kammen A. van (1979).** Development of the nitrogen-fixing and protein-synthesizing apparatus of bacteroids in pea root nodules. *Biochimica et biophysica acta. Nucleic acids and protein synthesis.* **562**:515-526.
- Bohnsack1 C. W. y Albert L. S. (1977).** Early Effects of Boron Deficiency on Indoleacetic Acid Oxidase Levels of Squash Root Tips. *Plant Physiol.* **59**: 1047-1050.
- Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D. (2004 a).** Why boron? *Plant Physiol. Biochem.* **42**:907–912.
- Bolaños L., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Brewin N. J. y Bonilla I. (2004 b).** The American Phytopathological Society Cell Surface Interactions of Rhizobium Bacteroids and Other Bacterial Strains with Symbiosomal and Peribacteroid Membrane Components from Pea Nodules. *MPMI.* **17( 2)**: 216–223.
- Bolaños L., Cebrián A., Redondo-Nieto M., Rivilla R. y Bonilla I. (2001).** Lectin-like glycoprotein PsNLEC-1 is not correctly glycosylated and targeted in boron deficient pea nodules. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **14**: 663–670.
- Bolaños L., Redondo-Nieto M., Bonilla I., Wall L.G. (2002).** Boron requirement in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiotic relationship. Its essentiality for Frankia BCU110501 growth and nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* **115**:563–570.

- Bolaños L., Brewin N. J., Bonilla I. (1996).** Effects of Boron on Rhizobium-Legume Cell-Surface Interactions and Nodule Development. *Plant Physiol.* **110(4)**:1249-1256.
- Bolaños L., Esteban E., de Lorenzo C., Fernández-Pascual M., de Felipe M.R., Gárate A. & Bonilla I. (1994)** Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) –Rhizobium nodules. *Plant Physiology* **104**: 85–90.
- Bolaños L. (1993).**Nuevas aportaciones al conocimiento del papel del boro en la fijación biológica de nitrógeno en forma libre (Cianobacterias) y en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. *Tesis Doctoral*.
- Bond L. (1948).** Origin and developmental morphology of root nodules oi *Pisum sativum*. *Botanical Gazette* **109**:411-434.
- Bonilla I., Bolaños L., Redondo-Nieto M. y Rivilla R. (2006).** Nutrición mineral en la simbiosis. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones*. pp: 207-220. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).
- Bonilla I., Mergold-Villaseñor C., Campos M.E., Sánchez N., Pérez H., López L., Castrejón L., Sánchez F. y Cassab G.I. (1997a)** The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyprolin-/proline-rich proteins. *Plant Physiology*, **115**: 1329-1340.
- Bonilla I., Pérez H., Cassab G., Lara M. y Sánchez F. (1997b)** The effect of boron deficiency on development in determinate nodules: changes in cell wall pectin contents and nodule polypeptide expression. En: R.W. Bell, B. Rerkasem, eds. *Boron in soils and plants*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 213-220.
- Bonilla I., Bolaños L. y Mateo P. (1995)** Interaction of boron and calcium in the cyanobacteria *Anabaena* and *Synechococcus*. *Physiologia Plantarum*, **94**: 31-36.
- Bonilla I., García-González M., Mateo P. (1990).** Boron requirement in Cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* **94**:1554–1560.
- Bonilla I., Cadahía C., Carpena O. y Hernando V. (1980).** Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet. *Plant and Soil.* **57(1)**:3-9.

- Bonsignorioa D., Peregoa L., Del Giaccioa L. y Cotelli F. (1996).** Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote*. **4**:101-108.
- Borshchenko G.P. (1970).** A protein-synthesizing system derived from roots of boron-deficient pea plants. En: M. Shkolnik, ed. *Fiziologicheskaya Rol' Mikroelementov u Rastenij (The Physiological Role of Trace Elements in Plants)*. Trudy Botanicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR., Nauka, Leningrad., **19**:61-71.
- Borthakur D., Barber C.E., Lamb J.W., Daniels M.J., Dowie J.A. y Johnston A.W.B. (1986).** A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *Rhizobium phaseoli* and is corrected by cloned DNA from the phytopathogen *Xanthomonas*. *Mol. General Genet.* **203**:320–323.
- Bradford M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bradley D. J. y Fry S. C. (1997).** Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomatoc cell-suspension cultures treated with fungal elicitors or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* **115**:87-92.
- Bradley D. J., Kjellbom P., y Lamb C. J. (1992).** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**:21-30.
- Bradley D. J., Butcher G.W., Galfre G., Wood E. A. y Brewin N. J. (1986).** Physical association between the peribacteroid membrane and lipopolysaccharide from the bacteroid outer membrane in *Rhizobium*-infected pea root nodule cells. *Journal of Cell Science*. **85**(1): 47-61.
- Breedveld M.W. y Miller K. J. (1994).** Cyclic ,B-Glucans of Members of the Family Rhizobiaceae. *Microbiological Reviews*. **58**(2):145-161.
- Breedveld M. W., Cremers H. C., Batley M., Posthumus M. A., Zevenhuizen L. P., Wijffelman C. A., Zehnder A. J. (1993).** Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol.* **175**:750–757.
- Brenchley W. E., Thornton H. G. (1925).** The relation between the development, structure and functioning of the nodules on *Vicia faba*, as influenced by the presence or absence of boron in the nutrient medium. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **98**: 373-398.



- Brewin N. J. (2004).** Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **23(4)**:293–316.
- Brewin N. J., Rathbun E. A. y Wisniewski J.-P. (2000).** Structure and development of infection threads. Pages 381-382 in: Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. F. E. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates, and W. E. Newton, eds. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands.
- Brewin N.J. (1991).** Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**:191-226.
- Brewin N. J., Robertson J. G., Wood E. A., Wells B., Larkins A. P., Galfre G. y Butcher G. W. (1985).** Monoclonal antibodies to antigens in the peribacteroid membrane from Rhizobium-induced root nodules of pea cross-react with plasma membranes and Golgi bodies. *EMBOJ.* **4**: 605-611.
- Brown P. H., Bellaloui, N., Wimmer M. A., Bassil E. S., Ruiz, J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F., Römheld V. (2002).** Boron in plant biology. *Plant Biol.* **4**:205–223.
- Brown P. H., Bellaloui N., Hu H.y Dandekar A. (1999).** Transgenically Enhanced Sorbitol Synthesis Facilitates Phloem Boron Transport and Increases Tolerance of Tobacco to Boron Deficiency. *Plant Physiol.* **119(1)**:17–20.
- Brownleader M. D., McNally P. E., Davies G. E. A., Trevan M. y Dey P. M. (1997).** Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cells. *Phytochemistry* **46**:1-9.
- Bueno P., Soto M.J., Rodríguez-Rosales M.P., Sanjuan J., Olivares J., and Donaire J.P. (2001).** Time course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during the early stages of Rhizobium-legume symbiosis. *New Phytol* **152**: 91–96.
- Buege J. A. y Aust S. D. (1978).** Microsomal Lipid Peroxidation In: Fleischer P; Packer, L. (eds) *Methods in Enzymology*. **52**:302 – 310.
- Burke C. N., Geiselman C. W. (1971)** Exact anhydride epoxy percentages for electron microscopy embedding (Rpon). *J Ultrastruct Res.* **36(1)**:119-26.

- Cakmak I. y Römheld V. (1997).** Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* . **193( 1-2):**71-83.
- Cakmak I., Kurz H., Marschner H. (1995).** Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.* **95:**11–18.
- Calvert H. E., Pence M. K., Pierce M., Malik N. S. A. y Bauer W. D. (1984).** Anatomical analysis of the development and distribution of Rhizobium infections in soybean roots. *Can. J. Botany-Revue Canadienne de Botanique* .**62:** 2375–2384.
- Camacho-Cristóbal J. J., González-Fontes A. (2007).** Boron deficiency decreases plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. *Planta*. **226(2):**443-451
- Campbell G. R. O., Sharypova L. A., Scheidle H., Jones K. M., Niehaus K., Becker A., y Walker G.C. (2003).** Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.* **185:** 3853–3862.
- Campbell G. O., Reuhs B. L. y Walker G. C. (1998).** Different phenotypic classes of *Sinorhizobium meliloti* mutants defective in synthesis of K antigen. *J. Bacteriol.* **180:** 5432–5436.
- Cárdenas L., Martínez A., Sánchez F., Quinto C. (2008).** Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J.* **56(5):**802-13.
- Cárdenas L., Vidali L., Domnguez J., Prez H., Snchez F., Hepler P. K., Quinto C. (1998).** Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to rhizobium etli nodulation signals *Plant Physiol.* **116(3):**871-7.
- Carpena R.O., Esteban E., Sarro M.J., Peñalosa J., Gárate A., Lucena J.J. y Zornoza P. (2000)** Boron and calcium distribution in nitrogen-fixing pea plants. *Plant Science*, **151:** 163-170.

- Catoira R., Timmers A. C. J., Maillet F., Galera C., Penmetsa R. V., Cook D., Denarie J., Gough C. (2001).** The HCL gene of *Medicago truncatula* controls Rhizobium-induced root hair curling. *Development* **128**:1507–1518.
- Cermola M., Fedorova E., Taté R., Riccio A., Favre R. y Patriarca E. J. (2000).** Nodule Invasion and Symbiosome Differentiation During *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* Symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **13**(7): 733–741.
- Chapman K. S. R., J. F. Jackson (1974).** Increased RNA labeling in boron-deficient root-tip segments. *Phytochemistry* **13**: 1311-1318.
- Chapman K.S.R. y Jackson J.F. (1974)** Increased RNA labelling in boron-deficient root tip segments. *Phytochemistry*, **13**: 1311-1318.
- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczar I., Bassler B. L., Hughson F. M. (2002).** Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. **415**(6871):545-9.
- Cheng H.P. y Walker, G. C. (1998).** Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180**:5183–5191.
- Cheon C. I., Lee N. G., Siddique A. B., Bal A. K. y Verma D. P. (1993).** Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *EMBO J.* **12**(11): 4125–4135.
- Cohen M. S. y Lepper R. Jr. (1977).** Effect of Boron on Cell Elongation and Division in Squash Roots. *Plant Physiology* **59**:884-887.
- Coke L. y Whittington W.J. (1968)** The role of boron in plant growth, IV. Interrelationships between boron and indol-3-yl acetic acid in the metabolism of bean radicles. *Journal of Experimental Botany*, **19**: 295-308.
- Colditz F., Nyamsuren O., Niehaus K., Eubel H., Braun H.-P. y Krajinski F. (2004).** Proteomic approach: Identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Molecular Biology*, **55**(1):109-120.

**Collinge D. B., Kragh K. M., Mikkelsen J. D., Nielsen K. K., Rasmussen U., Vad K. (1993).** Plant chitinases. *Plant J.* **3**: 31-40.

**Cooper J. B. y Long S. R. (1994).** Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by trans-Zeatin Secretion. *The Plant Cell.* **6(2)**:215-225.

**Crespo-Rivas J. C., Margaret I., Hidalgo A., Buendía-Clavería A. M., Ollero F. J., López-Baena F. J., Murdoch P. S., Rodríguez-Carvajal M. A., Soria-Díaz M. E., Reguera M., Lloret J., Sumpton D. P., Mosely J. A., Thomas-Oates J. E., van Brussel A. A. N., Gil-Serrano A., Vinardell J. M. y Ruiz-Sainz J. E. (2009).** Sinorhizobium fredii HH103 cgs Mutants Are Unable to Nodulate Determinate- and Indeterminate Nodule-Forming Legumes and Overproduce an Altered EPS. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **22**: 575–588.

**Cresswell C. F. y Nelson H. (1973).** The Influence of Boron on the RNA Level, -amylase Activity, and Level of Sugars in Germinating *Themeda triandra* Forsk Seed. *Annals of Botany* **37**:427-438.

**Cullimore J. V., Gebhart C., Saarelainen E., Miffling B. J., Idler K. B. y Barker R. F. (1984).** Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: Organ-specific expression of a multigene family. *J. MOI. Appl. Genetics.* **2**: 589-599.

**D'Haeze W. y Holsters M. (2002).** Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* **12(6)**:79-105.

**Dahiya P., Sherrier D. J., Kardailsky I. V., Borisov A. Y. y Brewin N.J. (1998).** Symbiotic Gene *Sym31* Controls the Presence of a Lectinlike Glycoprotein in the Symbiosome Compartment of Nitrogen-Fixing Pea Nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11(9)**:915-923.

**Dahiya P., Kardailsky I. V. y Brewin N. J. (1997).** Immunolocalization of PsNLEC-1, a lectin-like glycoprotein expressed in developing pea nodules. *Plant Physiol.* **115**:1431-1442.

**Dalton D. A., Post C. J., Langeberg L. (1991).** Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate and associated enzymes in soybean root nodules. *Plant Physiology* **96**: 812–818.

- Dalton D. A., Russell S. A., Hanus F. J., Pascoe G. A., Evans H. J. (1986).** Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3811–3815.
- Dalton DA, Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance CP, Sarath G (1993)** Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiol* **102**: 481–489.
- Dannel F., Römheld V. (2002).** Boron in plant biology. *Plant Biol.* **4**:205–223.
- de Faria, S. M.,McInroy, S. G. y Sprent, J. I. (1987).** The occurrence of infected cells with persistent infection threads in legume root nodules. *Can. J. Bot.* **65**:553–558.
- Dénarié J, Debellé F, Promé JC. 1996.** *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Reviews in Biochemistry* **65**, 503–535.
- Devirian T. A., Volpe S. L. (2003).** The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**:219–231.
- Doblin M. S., Kurek I., Jacob-Wilk D. y Delmer D. P. (2002).** Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1407– 1420.
- Dugger W. M., Palmer R. L. (1980).** Effect of boron on the incorporation of glucose from UDP-glucose into cotton fibers grown in vitro. *Plant Physiology.* **65**:266-273.
- Dunlap J., Minami E., Bhagwat A. A., Keister D. L. y Stacey G. (1996).** Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic B-glucan synthesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**:546–555.
- Dupre, J. N., Keenan, M. J., Hegsted, M. and Brudevold, A. M. (1994).** Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D deficient diet. *Env. Health Perspect.* **102 (7)**: 55–58.
- Dylan T., Helinski D. R.y Ditta G. S. (1990).** Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**:1400–1408.

- Eckhert C., Barranco W. y Kim D. (2007).** Boron and Prostate Cancer a Model for Understanding Boron Biology Libro *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition* 291-297. Editor Springer Netherlands.
- Eckhert, C. D. (1998).** Boron stimulates embryonic trout growth. *J.Nutr.* **128**: 2488–2493.
- Evans P. J., Gallesi D., Mathieu C., Hernandez M., de Felipe M., Halliwell B., Puppo A. (1999).** Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta.* **208**:73–79.
- Fahraeus G. (1957)** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique. *Journal of General Microbiology*, **16**: 374-381.
- F El-Shintinawy. (1999).** Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves. **36**(4). *Photosynthetica.* **93**(2):565–573.
- Fedorova E., Thomson R., Whitehead L. F., Maudoux O., Udvardi M. K., Day D. A. (1999).** Localization of H(+)-ATPases in soybean root nodules. *Planta.* **209**(1):25-32.
- Felle H. H., Kondorosi E., Kondorosi Á. y Schultze M. (1999).** Elevation of the Cytosolic Free  $[Ca^{2+}]$  Is Indispensable for the Transduction of the Nod Factor Signal in Alfalfa. *Plant Physiol.* **121**(1): 273–280.
- Felle H. H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1995).** Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* **7**:939–947.
- Ferguson B. J., Mathesius U. (2003).** Signaling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation.* **22**: 47–72.
- Ferguson M. A. J. y Williams A. F. (1988).** Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Ann. Rev.Biochem.* **57**: 285–320.
- Ferrol N., Belver A., Roldan M., Rodriguez-Rosales, M. P. y J. P. Donaire. (1993).** Effects of Boron on Proton Transport and Membrane Properties of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cell Microsomes. *Plant Physiol.* **103**(3): 763–7.

- Ferrol N., Donaire J. P. (1992).** Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Sci.* **86**: 41–47.
- Fincher G. B., Stone B.A, Clarke A. E. (1983).** Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Annu Rev Plant Physiol.* **34**: 47-70.
- Findekleee P., Goldbach H. E. (1996).** Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Cucurbita pepo* roots. *Bot. Acta* **109**:463–465.
- Flach J., Pilet P-E., Jollès P. (1992).** What's new in chitinase research? *Experientia* **48**: 701-716.
- Fleischer A., O'Neill M. A., Ehwald R. (1999).** The pore size of nongraminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.* **121**: 829–838.
- Fort D. J. (2002).** Boron deficiency disables *Xenopus laevis* oocyte maturation events. *Biol Trace Elem Res.* **85**(2):157-.
- Fort D. J., Stover E. L., Strong P. L. Murray F. J. (1999).** Effect of boron deprivation on reproductive parameters in *Xenopus laevis*. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine.* **12**(3):187-204.
- Fort D. J., Stover E. L., Strong P. L., Murray F. J., Keen C.L. (1999).** Chronic feeding of a low boron diet adversely affects reproduction and development in *Xenopus laevis*. *J Nutr.* **129**(11):2055-60.
- Fortin M. G., Zelechowska M. y Verma D. (1985).** Specific targeting of membrane nodulins compartment in soybean nodules to the bacteroid-enclosing. *The EMBO Journal.* **4**(12):3041 - 3046.
- Foucher F. y Kondorosi E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago* *Plant Molecular Biology* **43**:773–786, 2000.
- Fournier J., Timmers A. C., Sieberer B. J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D. G. (2008).** Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol.* **148**(4):1985-95.

- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C. y Bisseling T. (1992).** Developmental Aspects of the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Molecular Biology*. **19**:89-107.
- Fraser R. (1981).** Evidence for the occurrence of the “pathogenesis-related proteins” in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol. Plant Pathol.* **19**:76.
- Fraysse N., Couderc F. y Poinso V. (2003).** Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *J. Biochem.* **270**: 1365–1380.
- Fristensky B., Riggleman R. C., Wagoner W., Hadwiger L. A. (1985).** Gene expression in susceptible and disease resistant interactions of peas induced with *Fusarium solani* pathogens and chitosan. *Physiological Plant Pathology*. **27**:15-28.
- Gage D. J. (2004).** Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68(2)**: 280–300.
- Gallardo-Williams M. T. (2004).** Boron Supplementation Inhibits the Growth and Local Expression of IGF-1 in Human Prostate Adenocarcinoma (LNCaP) Tumors in Nude Mice. *Toxicologic Pathology*. **32(1)**:73-78.
- Gárate A., Esteban E., Lucena J.J., Carpena R.O. y Bonilla I. (1993)** Effect of different boron levels on nodulated and non-nodulated pea plants. En: N.J. Barrow, ed. Plant nutrition from genetic engineering to field practice. *Kluwe Academic Publishers*, Dordrecht, pp 417-420.
- Gárate A., Cadahía C. y Carpena R.O. (1980)** Estudio comparativo de métodos analíticos de B en suelos usando Azometina H como reactivo. En: III Congreso Nacional de Química (Química Agrícola y Agroalimentaria) Vol 1. Sevilla, pp 273-280.
- García-González M., Mateo P. y Bonilla I. (1988)** Boron protection for O<sub>2</sub> diffusion in heterocysts of *Anabaena* sp PCC7119. *Plant Physiology*, **87**: 785-789.
- García-González M., Mateo P., Bonilla I (1991)** Boron requirement for envelope structure and function in *Anabaena* PCC 7119 heterocysts. *J Exp Bot* **42**: 925-929.
- Gauch H. G. y Dugger, Jr W. M. (1953).** The Role of Boron in the Translocation of Sucrose. *Plant Physiology* **28**:457-466.



**Geurts R. y Bisseling T. (2002).** Rhizobium Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell*. **14**:239-249.

**Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J. C., Jaubert M., Simon D., Cartieaux F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Mangenot S., Segurens B., Dossat C., Franck W. L., Chang W. S., Saunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich D., Verméglio A., Médigue C., Sadowsky M. (2007).** Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*. **316**(5829):1296-7.

**Goldbach H. E., Yu Q., Wingender R., Schulz M., Wimmer M., Findeklee P., Baluk F. (2001).** Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. **164**(2): 173 – 181.

**Goldbach H.E. (1997)** A critical review of current hypotheses concerning the role of boron in higher plants. Suggestion for further research and its methodological requirements. *Journal of Trace Microprobe Technology*, **15**: 51-92.

**Goldbach H. E., Blaser-Grill J., Lindemann N., Porzelt M., Hörrmann C., Lupp, B., Gessner B. (1991).** Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic processes, in Randall, D. D., et al.: *Current Topics in Plant Biochemistry y Physiology*. **10**:195–220.

**Goldberg S. (1997)** Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*, **193**: 35-48.

**Goodrum L. J., Patel A., Leykam J. F. y Kieliszewski M. J. (2000).** Gum Arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactanglycoproteins. *Phytochem*. **54**: 99–106.

**Goormachtig S., Capoen W., Holsters M. (2004).** Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends Plant Sci* **9**:518–522.

**Gore R. S. y Miller K. J. (1993)** Cyclic ,6- 1,6 - 1,3 Glucans Are Synthesized by *Bradyrhizobium japonicum* Bact e r o i d s w i t h i n S o y bean (*Glycine max*) Root Nodules. *Plant Physiol*. **102**: 191-194.

- Gorustovich A. A., Steimetz T., Nielsen F. H. Guglielmotti M.B. (2008).** Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet *Anat Rec (Hoboken)*. 291(4):441-7.
- Govers F., Gloudemans T., Moerman M., van Kammen A. y Bisseling T. (1985).** Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *The EMBO Journal*. 4(4):861-867.
- Grant S. R., Fisher E. J., Chang J. H., Mole B. M. y Dangl J. L. (2006).** Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 60: 425-449.
- Gray J. X., Zhan H. J., Levery S. B., Battisti L., Rolfe B. G. y Leigh J. A. (1991).** Heterologous exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234 and consequences for nodule development. *J Bacteriol*. 173(10):3066–3077.
- Grill E. y Himmelbach A. (1998).** ABA signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*. 1 (5):412-418.
- Groat R. G., Vance C. P. (1982).** Root and Nodule Enzymes of Ammonia Assimilation in Two Plant-Conditioned Symbiotically Ineffective Genotypes of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*. (3):614-618.
- Gucciardo S., Rathbun E. A., Shanks M., Jenkyns S., Mak L., Durrant M. C., Brewin N.J. (2005).** Epitope tagging of legume root nodule extensin modifies protein structure and crosslinking in cell walls of transformed tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact*. 18(1):24-32.
- Günther C., Schlereth A., Udvardi M. y Ott T. (2007)** Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1596-1603.
- Guse A. H. (2005)** Second messenger function and the structure–activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *FEBS J*. 272: 4590–4597
- Guérardel Y., Chang L.-Y., Maes E., Huang C.-J., y Khoo K.-H. (2006).** Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern. *Glycobiology*. 16 (3):244–257.

- Han S., Chen L. S., Jiang H. X., Smith B.R., Yang L. T., Xie C.Y. (2008).** Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *J Plant Physiol.* **165(13)**:1331-41.
- Hanfrey C., Fife M., Buchanan-Wollaston, V. (1996).** Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **30**: 597-609.
- Hegsted M., Keenan M. J., Siver F., Wozniak P. (1991).** Effect of boron on vitamin D deficient rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **28**:243–255.
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H. P., Van Kammen A., Bisseling T. (1994).** Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* **105**: 787-797.
- Hepler P. K., Vidali L., Cheung A. Y. (2001).** Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 159–187.
- Hernandez-Jimenez M. J., Lucas M. M., Rosario de Felipe M. (2002).** Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiology and Biochemistry.* **40**: 645–657.
- Hicks A., Davis S., Rodger J., Helme-Guizon A., Laroche S., Mallet J. (1997).** Synapsin I and syntaxin 1B: Key elements in the control of neurotransmitter release are regulated by neuronal activation and long-term potentiation in vivo. *Neuroscience.* **79(2)**: 329-340
- Hill S. (1988).** How is nitrogenase regulated by oxygen? *FEMS Microbiology* **4**:111–129.
- Hirsch, A. M. (1999).** Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:320-326.
- Hirsch A. M., Torrey J. G. (1980).** Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Can J Bot.* **58**:856–866.
- His W. I., Mackinnon I., Marry M. , Max I. (2002).** Electron Energy Loss Spectroscopy Methodology for Boron Localisation in Plant Cell. Boron in Plant and Animal Nutrition. Goldbach H. E., Rerkasem B., Wimmer M. A., Brown P. H., Thellier M., Bell R. W.. Edition: Springer.
- Hu H. y P. Brown. (1997).** Absorption of boron by plant roots. *Plant Soil.* **193(1-2)**: 49-58.

- Hu H., Penn S. G., Lebrilla C. B., Brown P. H. (1997).** Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.* **113**:649–655.
- Hunt, C. D. (2002).** Boron-binding biomolecules: A key to understanding the beneficial physiological effects of dietary boron from prokaryotes to humans. En: Goldbach, H. E., et al.: Boron in plant and animal nutrition. *Kluwer Academic/Plenum Publ.* 21–36.
- Hunt C.D. (2000).** Dietary Boron is a Physiological Regulator of the Normal Inflammatory Response. *Trace Elements in Man and Animals*. Springer 1071-1076.
- Hunt, C. D. (1998).** Dietary boron enhances the beneficial effects of exercise training on bone calcium, phosphorus and magnesium concentrations in the rat. *FASEB J.* **12**: A205.
- Hunt, C. D. (1989).** Dietary boron modified the effects of magnesium and molybdenum on mineral metabolism in the cholecalciferoldeficient chick. *Biol. Trace Elem. Res.* **22**: 201–220.
- Hunt S., Layzell D. B. (1993).** Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu Rev Plant Physiol* **44**: 483–511.
- Iannetta P.P.M., de Lorenzo C., James E.K., Fernández-Pascual M.M., Sprent J.I., Lucas M.M., Witty J.F., de Felipe, M.R. & Minchin F.R. (1993).** Oxygen diffusion in lupin nodules. Visualization of diffusion barrier operation, *Journal of Experimental Botany*. **44**:1461–1467.
- Ingham P. W. (2009).** The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet.* **15**(18):107-12.
- Inon de Iannino N. y Ugdale R.A. (1993).** Biosynthesis of cyclic beta-(1–3), beta-(1–6) glucan in Bradyrhizobium spp. *Arch. Microbiol.* **159**:30–38.
- Iturriaga, EA; Leech, MJ; Barratt, DHP; Wang, TL. (1994).** Two ABA responsive proteins from pea (*Pisum sativum* L.) are closely related to intracellular pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol.* **24**:235–240.
- Iwai H., Masaoka N., Ishii T. y Satoh S. (2002)** A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* **99**:16319–16324.

- Jackson J. F. (1989).** Borate control of protein secretion from *Petunia* pollen exhibits critical temperature discontinuities. *Sex. Plant Reprod.* **2**:11–14.
- Jamet A., Mandon K., Puppo A., Hérout D. (2007).** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J. Bacteriol.* **189**(23):8741-5.
- Janczarek M., Skorupska A. (2004).** Regulation of *pssA* and *pssB* gene expression in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors. *Antonie van Leeuwenhoek* . **85**:217–227.
- Jaweed M.M., Scott E.G. (1967).** Effect of boron on ribonucleic acid and indoleacetic acid metabolism in the apical meristems of sunflower plants. *Proc W Va Acad Sci* **39**: 186-193.
- Johnston A. W. B., Beringer, J. E. (1975).** Identification of the *Rhizobium* strains in pea nodules using genetic markers. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 343-350.
- Jones K. M., Sharopova N., Lohar D. P., Zhang J. Q., VandenBosch K. A., Walker G. C. (2008).** Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(2):704-9.
- Kageshita T., Hirai S., Rimara T., Hanai N., Olita S. y Ono T. (1995).** Association between Sialyl Lewis<sup>x</sup> Expression and Tumor Progression in Melanoma. *Cancer Research.* **55**:1748-1751.
- Kanebo Y., Newcomb E. H. (1990).** Specialization for ureide biogenesis in the root nodules of black locust (*Robina pseudoacacia* L.) an amide exporter. *Protoplasma* **157**:102-11.
- Kannenberg E.L. y Brewin N.J. (1989)** Expression of a cell surface antigen from *Rhizobium leguminosarum* 3841 is regulated by oxygen and pH. *Journal of Bacteriology*, **171**: 4543-4548.
- Kannenberg E.L. y Carlson R.W. (2001).** Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* **39**:379–391.
- Kardailsky I. V., Brewin N. J. (1996).** Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **8**1: 689–5.

- Kato Y., Miwa K., Takano J., Wada M. y Fujiwara T. (2009).** Highly Boron Deficiency-Tolerant Plants Generated by Enhanced Expression of NIP5;1, a Boric Acid Channel. *Plant Cell Physiol.* **50(1)**: 58–66.
- Kavroulakis N., Flemetakis E., Aivalakis G., Katinakis P. (2000).** Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 14–22.
- Kav N. N. V., Srivastava S., Goonewardene L. y Blade, S. F. (2004).** Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* L. in response to salinity. *Ann. Appl. Biol.* **145 (2)**: 217 – 230.
- Kawashima K, Suganuma N, Tamaoki M, Kouchi H. (2001).** Two types of pea leghemoglobin genes showing different O<sub>2</sub>-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. *Plant Physiol.* **125(2)**:641-51.
- Keating D. H., Willits M. G. y Long S. R. (2002).** A *Sinorhizobium meliloti* Lipopolysaccharide Mutant Altered in Cell Surface Sulfation. *J. Bacteriol.* **184(23)**: 6681–6689.
- Kiss E., Kereszt A., Barta F., Stephens S., Reuhs B.L., Kondorosi A. y Putnoky P. (2001).** The *rkp3* gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain specific genes that determine K-antigene structure. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1395–1403.
- Kobayashi M., Matoh T. y Azuma J. (1996).** Two chains of Rhamnogalacturonano II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiology*, **110**: 1017-1020.
- Kobayashi Y., Kobayashi I., Funaki Y., Fujimoto S., Takemoto T. y Kunoh H. (1997).** Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* **11**: 525-537.
- Kohno J., Kawahata T., Otake T., Morimoto M., Mori H., Ueba N., Nishio M., Kinumaki A., Komatsubara S., Kawashima K. (1996).** Boromycin, an anti-HIV antibiotic. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**:1036–1037.
- Kohorn B. D., Kobayashi M., Johansen S., Friedman H. P., Fischer A., Byers N. (2006).** Wall-associated kinase 1 (WAK1) is crosslinked in endomembranes, and transport to the cell surface requires correct cell-wall synthesis. *J. Cell Sci.* **119**: 2282–2290.

- Koshiba T., Kobayashi M. & Matoh T. (2009).** Boron nutrition of tobacco BY-2 cells. V. Oxidative damage is the major cause of cell death induced by boron deprivation. *Plant and Cell Physiology* **50**: 26-36.
- Kouchi H., Kumazawa K. (1976).** Anatomical responses of root tips to boron deficiency: III. Effect of boron deficiency on sub-cellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. *Soil Sci Plant Nutr.* **22**:53–71.
- Krishnaswamy S. S., Srivastava S., Mohammadi N. M., Rahman M. H., Deyholo M. K. y Kav N. N. V. (2008).** Transcriptional profiling of pea ABR17 mediated changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **8**:91.
- Krone P. H., Evans T. G., Blechinger S. R. (2003).** Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* **14**(5):267-74.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997).** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**:251–275.
- Lanoue L., Taubeneck M. W., Muniz J., Hanna L. A., Strong P. L., Murray F. J., Nielsen F. H., Hunt C. D. y Keen C. L. (1998).** Assessing the effects of low boron diets on embryonic and fetal development in rodents using in vitro and in vivo model systems. *Biological Trace Element Research* **66**:271-298.
- Laughlin ST, Baskin JM, Amacher SL, Bertozzi CR. (2008).** In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science.* **320**(5876):664-7.
- Lawson C., Rolfe B. y Bjordjevic M. (1995).** Rhizobium inoculation induces condition-dependent changes in the flavonoid composition of root exudates in *Trifolium subterraneum*. *Aust. J. Plant Physiol* **23**: 93-101.
- Lee H. C. (2002).** Cyclic ADP-Ribose and NAADP: Structures, Metabolism, and Functions. *Kluwer Academic Publishers.* Springer.
- Lee S. y Aronoff S. (1967).** Boron in Plants: A Biochemical Role. *Science* **158**(3802):798-799.
- Lehtovaara P., Perttilä U. (1978).** Bile-pigment formation from different leghemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation. *Biochem. J.* **176**: 359- 364.

- Leigh J. A. y Coplin D. C. (1992).** Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:307-346.
- Leigh J.A., Singer E.R. y Walker G.C. (1985).** Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl Acad. Sci.* **82**:6231–6235.
- Lele Z, Engel S, Krone P, H. (1997).** hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Dev Genet.* **21(2)**:123-33.
- Lers A., Jiang W. B., Lomaniec E. Aharoni N. (1998).** Proteins functionally and immunogenically related to pathogenesis-related proteins are induced during parsley leaf senescence. *Physiologia Plantarum*, 103(4):497-502.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994).** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* **79(4)**:583-93.
- Lewin J. C. (1966).** Boron as a growth requirement for diatoms. *J Phyco.* **2**: 160-163.
- Lewis D. H. (1979).** Boron lignifications and the origin of vascular plants. A unified hypothesis. *New Phytologist.* **84(2)**:209 – 229.
- Lhuissier F. G. P., De Ruijter N. C. A., Sieberer B. J., Esseling J. J., Emons A. M. C. (2001).** Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art. *Ann Bot (Lond)* **87**: 289–302.
- Li C. J., Pfeffer H., Dannel F., Ro mheld V., Bangerth F. (2001).** Effects of boron starvation on boron compartmentation, and possibly hormone-mediated elongation growth and apical dominance of pea (*Pisum sativum*) plants. *Physiol Plant.* **111**:212–9.
- Liakopoulos G, Karabourniotis G. (2005).** Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: a combined growth chamber and field study. *Tree Physiol.* **25(3)**:307-15.
- Limpens E., Bisseling T. (2003).** Signaling in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 343–350.



- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. (2003).** LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630–633.
- Liu J-J, Ekramoddoullah A. K. M. (2006).** The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol.* **68**:3–13.
- Liu X, Huang B, Lin J, Fei J, Chen Z, Pang Y, Sun X, Tang K. (2006).** A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible. *J Plant Physiol.* **163**(5):546-56.
- Lodwig E. M., Hosie A. H., Bourdès A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J. A., Poole P. S. (2003).** Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature.* **422**(33):722-6.
- Long S. R. (1996).** Rhizobium Symbiosis: Nod Factors in Perspective. *The Plant Cell*, **8**:1885-1898.
- Loria R., Coombs J., Yoshida M., Kers J. y Bukhalid R. (2003).** A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiol. Mole. Plant Pathol.* **62**: 65–72.
- Loscos J., Matamoros M. A. y Becana M. (2008).** Ascorbate and Homogluthathione Metabolism in Common Bean Nodules under Stress Conditions and during Natural Senescence. *Plant Physiol.* **146**(3): 1282–1292.
- Lotocka B., Kopcinska J., Gorecka M. y Golinowski W. (2000).** Formation and abortion of root nodule primordia in *Lupinus luteus* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **42**: 87–102.
- Lotocka B., Kopcinska J. y Golinowski W. (1997).** Morphogenesis of root nodules in white clover. I. Effective root nodules induced by the wild type *Rhizobium leguminosarum* biovar. trifolii. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **66**: 273–292.
- Loughman B. C. (1961).** Effect of boric acid on the phosphoglucomutase of pea seeds. *Nature.* **191**:1399–1400.

- Maccarrone M., Rossi A., Avigliano L. y Agro A. F. (1991).** Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedlings under different growth-conditions. *Plant Science* **79**:51-55.
- Madsen E. B., Madsen L. H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N. (2003).** A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640.
- Maevskaya A. N., Alekseeva K. A. (1966).** Oxidative phosphorylation in pea plants under conditions of boron deficiency. *Engl. sum. Fiziol Rast* **13**: 1054-8.
- Marschner H. (1995).** Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. London: *Academic Press*.
- Martínez F., Mateo P., Bonilla I., Fernández-Valiente E. y Gárate A. (1986).** Growth of *Anacystis nidulans* in relation to boron supply. *Israel Journal of Botany*, **35**: 17-21.
- Martínez-Abarca F., Herrera-Cervera J. A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T. y Olivares J. (1998).** Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **11**:153–155.
- Matamoros M. A., Baird L. M., Escuredo P. R., Dalton D. A., Minchin F. R., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M. C., Moran J. F., Gordon A. J., Becana M. (1999).** Stress-induced legume root nodule senescence: physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* **121**: 97–111.
- Mateo P., Bonilla I., Fernández-Valiente E. y Sánchez-Maeso E. (1986)** Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119. *Plant Physiology*, **81**: 17-21.
- Mateos P. F., Baker D. L., Petersen M., Velazquez E., Jimenez-Zurdo J. I., Martinez-Molina E., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D. H. y Dazzo F. B.. 2001.** Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can. J. Microbiol.* **47**:475-487.
- Mathesius U., Weinman J. J., Rolfe B. G. y Djordjevic M. A. (2000).** Rhizobia can induce nodules in white clover by “hijacking” mature cortical cells activated during lateral root development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 170–182.
- Matoh T., Takasaki M., Takabe K. y Kobayashi M. (1998)** Immunocytochemistry of Rhamnogalacturonan II in Cell Walls of Higher Plants. *Plant and Cell Physiology*, **39**: 483-491.

- Matsunaga T., Ishii T., Matsumoto S., Higuchi M., Darvill A., Albersheim P., O'Neill M. A. (2004).** Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol.* **134**: 339–351.
- Mazurek M. y Perlin A. S. (1963).** Borate complexing by five-membered-ring vic-diols vapor pressure equilibrium and N.M.R. spectral observations. *Canadian Journal of Chemistry.* **41**(10):2403-2411.
- McIlrath W. J. y Skok J. (1964).** Boron Nutrition and Lignification in Sunflower and Tobacco Stems. *Botanical Gazette*, **125**(4): 268-271 .
- McIlrath W. J., Mitchell J. W., Schneider I. R. y Gauch H. G. (1960).** Boron and Sugar Translocation in Plants. *Science.* **132**( **3431**): 898 – 899.
- Meacham S.L., Elwell K. E., Ziegler S. Y Carper s. W. (2007).** Boric acid inhibits cell growth in breast and prostate cancer cell lines. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, Ed. F. Xu, Springer Publishing Company, New York, NY, pp 299-306.
- Meins F. J., Neuhaus J-M., Sperisen C., Ryals J. (1992).** The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In T Boller, F Meins, eds, *Genes Involved in Plant Defense*. Springer, Vienna, pp 245-282.
- Mellor R. B. (1989)** Bacteroids in the Rhizobium-Legume Symbiosis Inhabit a Plant Internal Lytic Compartment: Implications for other Microbial Endosymbioses *Journal of Experimental Botany* **40**(8):831-839.
- Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A. E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E. (2006).** Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(13):5230-5.
- Miller D., De Ruijter N. C. A., Bisseling T., Emons A M. C. (1999).** The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochitooligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J* **17**: 141–154.

**Miller D.D., Leferink-ten Klooster H. B., Emons A. M. C. (2000).** Lipochito-oligosaccharide nodulation factors stimulate cytoplasmic polarity with longitudinal endoplasmic reticulum and vesicles at the tip in vetch root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1385–1390.

**Mithöfer A., Fliegmann J., Daxberger A., Ebel C., Neuhaus-Url G., A. Bhagwat A., Keister D. L., Ebel J. (2001).** Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis by L-glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS* **508**:191-195.

**Mithöfer A., Bhagwat A. A., Keister D. L. y Ebel J. (2001).** *Bradyrhizobium japonicum* mutants defective in cyclic α-glucanes synthesis show enhanced sensitivity to plant defense responses. *Z. Naturforsch.* **56**:581–584.

**Mithöfer A., Ebel J., Bhagwat A. A., Boller T., Neuhaus-Url G. (1999).** Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β-glucan or chitin elicitors. *Planta* **207**: 566–574.

**Mithöfer A., Bhagwat A. A., Feger M., Ebel J. (1996).** Suppression of fungal β-glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6-β-glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Planta* **199**: 270–275.

**Mitra R. M. y Long S. R. (2004).** Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol.* **134**:595-604.

**Miwa K., Takano J., Fujiwara T. (2006).** Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **46**:1084–1091.

**Moiseyev G. P., Beintema J. J., Fedoreyeva L. I., Yakovlev G. I. (1994).** High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus- elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta.* **193**:470–472.

**Monahan-Giovanelli H., Pinedo C. A. y Gage D. J. (2006)** Architecture of Infection Thread Networks in Developing Root Nodules Induced by the Symbiotic Bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **140(2)**: 661–670.

- Moreau S., Davies M. J., Mathieu C., Herouart D., Puppo A. (1996).** Lb derived radicals. Evidence for multiple protein-derived radicals and the initiation of peribacteroid membrane damage. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 32557–32562.
- Mort A. J y Grover P. B. (1988).** Characterization of Root Hair Cell Walls as Potential Barriers to the Infection of Plants by Rhizobia. *JR.Plant Physiol.* **86(2)**: 638–641.
- Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Denis-Larose C. y Massie B. (1997).** Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress- induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **17( 9)**:5317-5327.
- Mylona P., Moerman M., Yang W.-C., Gloudemans T., Van De Kerckhove J., van Kammen A. (1994).** The root epidermis-specific pea gene *RH2* is homologous to a pathogenesis-related gene. *Plant Mol Biol.* **26**:39–50.
- Nakano Y., Asada K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867–880.
- Newman M-A. von Roepenack-Lahaye E., Parr A., Daniels M., Maxwell D. J. (2002).** Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal:Volume* **29(4)**: 487-495.
- Newman M-A., Daniels M. J. y Dow J. M.(1997).** The Activity of Lipid A and Core Components of Bacterial Lipopolysaccharides in the Prevention of the Hypersensitive Response in Pepper. **10(7)**:926-928.
- Newcomb W., D. Sippell y R. L. Petterson (1979).** The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativa* root nodules. *Can. J. Bot.*, **57**: 2603–2616.
- Nielsen F. H. (2000).** The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition.* **16**:512-4.
- Nielsen F. H. (1997).** Boron in human and animal nutrition. *Plant and soil.* **193**:199-208.
- Nielsen, F. H. (1996).** Evidence for the nutritional essentiality of boron. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **9**:215–229.

- Noguchi K., Dannel F., Pfeffer H., Romheld V., Hayashi H., Fujiwara T. (2000).** Defect in root–shoot translocation of boron in *Arabidopsis thaliana* mutant *bor1-1*. *J. Plant Physiol.* **156**:751–755.
- Noguchi K., Yasumori M., Imai T., Naito S., Matsunaga T., Oda H., (1997).** *bor1-1*, an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *Plant Physiol.* **115**:901–906.
- Nyamsuren O., Colditz F., Rosendahl S., Tamasloukht M., Bekel T., Meyer F., Küster H., Franken P., Krajinski, F.. (2003).** Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**, 17-26.
- Oertli J. J., Richardson W. F. (1970).** The mechanism of boron immobility in plants. *Physiol Plant.* **23**:108–116.
- Ogilvie A. (1992).** Extracellular functions for ApnA, AP4A and other Dinucleoside Polyphosphates CRC Press Inc: England (pp) 229–273. (In: McLennan, A.G. (ed)).
- Oldroyd G. E., Downie J. A. (2008).** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol.* **59**:519-46.
- Oldroyd G. E. D., Engstrom E. M., Long S. R. (2001).** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**:1835–1849.
- O'Neill M. A., Warrenfeltz D., Kates. K; Pellerin, P., Doco T., Darvill A. G., Albersheim P. (1996).** Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Journal of Biological Chemistry.* **271**:22923–22930.
- O'Neill, M. A., Eberhard S., Albersheim P., Darvill A. G. (2001).** Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science.* **294**:846–849.
- O'Neill, M. A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A. G. (2004).** Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review in Plant Biology.* **55**:109–139.

- Park M., Li Q., Shcheynikov N., Muallem S., Zeng W. (2005).** Borate transport and cell growth and proliferation. Not only in plants. *Cell Cycle*. **4(1)**:24-6.
- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Zeng, W. Z., Muallem, S. (2004).** NaBC1 is an ubiquitous electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Molecular Cell* **16**: 331–341.
- Parniske M., Schmidt P. E., Kosch K., Müller P. (1994).** Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 631-638.
- Pawa S., Ali, S. (2006).** Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 89–98.
- Peiter E., Sun J., Heckmann A. B., Venkateshwaran M., Riely B. K., Otegui M. S., Edwards A., Freshour G., Hahn M. G., Cook D. R., Sanders D., Oldroyd G. E., Downie J. A., Ané J. M.. (2007).** The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol.* **145(1)**:192-203.
- Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. (2007).** Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J Exp Bot.* **58(7)**:1637-49.
- Penland J. G. (1998).** The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Bio. Trace Elem. Res.* **66**: 299-317.
- Perkins D. N., Pappin D. J. C., Creasy D. M., Cottrell J. S. (1999).** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data Imperial Cancer Research Fund, London, UK. Matrix Science Ltd., London, UK. 1999
- Perotto S., Donovan N., Drobak B.J. & Brewin N.J. (1995).** Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**:560–568.
- Perotto S., Brewi, N. J., y Kannenberg E. L. (1994).** Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:99-112.

- Perotto S., VandenBosch K.A., Butcher G.W. & Brewin N.J. (1991).** Molecular composition and development of the plant glycocalyx associated with the peribacteroid membrane of pea root nodules. *Development*. **112**:763–773.
- Peterson R. L., Farquhar M.L. (1996).** Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *Bot Rev* **62**: 1–40.
- Pladys D., Vance P. C. (1993).** Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol* **103**: 379–384.
- Pladys D. y Rigaud J. (1985).** Senescence in French-bean nodules: Occurrence of different proteolytic activities. *63*(1):43-48.
- Pollard A. S., Parr A. J. y Loughman B. C. (1977).** Boron in Relation to Membrane Function in Higher Plants. *J. Exp. Bot.* **28**: 831-841.
- Power P. P. and Woods W.G. (1997).** The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil*. **193**(1-2):1-13.
- Prell J. y Poole P. (2006).** Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol* **14**(4):161-8.
- Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M. M., de Felipe M. R., Harrison J., Vanacker H. y Foyer C. F. (2005).** Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*. **165**: 683-701.
- Puppo A., Herrada G. y Rigaud J. (1991).** Lipid Peroxidation in Peribacteroid Membranes from French-Bean Nodules. *Plant Physiol*.
- Putoczki T, Gerrard J. y Sandra J. (2007).** Influence of Boron on Xylogenesis in Pinus radiata organ cultures. En: *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition: Proceedings of the 3rd International Symposium on All Aspects of Plant and Animal Boron Nutrition*. Escrito por Fangsen Xu, SpringerLink Springer, 2007. pp:47-62.



- Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E. M., Albrektsen A. S., James E. K., Thirup S., Stougaard J. (2007).** LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* **26**: 3923–3935.
- Rae A. L., Bonfante-Fasolo P. y Brewin N. J. (1992).** Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium eguminosarum* *The Plant Journal* **2(3)**: 385-395.
- Rae A. L., Perotto S., Knox J. P., Kannenberg E. L. y Brewin N. J. (1991).** Expression of extracellular glycoproteins in the uninfected cells of developing pea nodule tissue. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**: 563–570.
- Rajaratnam, J. A. y Lowry, J. B. (1974).** The role of boron in the oil-palm (*Elaeis guinensis*). *Ann Bot* **38**: 193-200.
- Ralston N. V. C., Hunt, C. D. (2001).** Diadenosine phosphates and S-adenosylmethionine: novel boron binding biomolecules detected by capillary electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **1527**:20–30.
- Rathbun E. A. y Brewin N. J. (2005).** Root Nodule Extenins in Infection Thread Development. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment. Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress.
- Rathbun E. A., Naldrett M. J. y Brewin N. J.. (2002).** Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:350-359.
- Raven JA (1980).** Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.* **84**:231–249.
- Redondo-Nieto M., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E., Bonilla I., Bolaños L. (2002).** Nutritional Influence of Boron and  $\text{Ca}^{2+}$  on Nodule Organogenesis in Legumes, Fifth European Nitrogen Fixation Conference, Abstract 8.22, Norwich
- Redondo-Nieto M. (2002).** Estudio de la relación B- $\text{Ca}^{+2}$  en la simbiosis Rhizobiaceae-Leguminosas. Tesis Doctoral.

- Redondo-Nieto M., Wilmot A., El-Hamdaoui A., Bonilla I., Bolaños L. (2003).** Relationship between boron and calcium in the N<sub>2</sub>-fixing legume–rhizobia symbiosis. *Plant Cell Environ.* **26**:1905–1915.
- Rees D. C., Akif Tezcan F., Haynes C. A., Walton M. Y., Andrade S., Einsle O., Howard J. B. (2005).** Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* **363(1829)**:971-84.
- Reuhs B. L., Glenn J., Stephens S. B., Kim J. S., Christie D. B., Glushka J. G., Zablackis E., Albersheim P., Darvill A. G., O'Neill M. A. (2004).** L-Galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient mur1 Arabidopsis mutant. *Planta* **219**: 147–157.
- Reuhs, B.L., Carlson, R.W. & Kim, J.S. (1993).** *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:3570–3580.
- Reuber B. L., Long S. y Walker G. C. (1991).** Regulation of *Rhizobium meliloti* exo genes in free-living cells and in plants examined by using TnphoA fusions. *J. Bacteriol.* **173**: 426–434.
- Ridge, R. W. y Rolfe B. G. (1985).** *Rizobium* sp. degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:717-720.
- Riggleman R.C., Fristensky B. y Hadwiger L.A. (1985).** The disease resistance response in pea is associated with increased mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **4**:81–86.
- Robertson G. A. y Loughman B. C. (1973).** Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba*. *New Phytologist.* **73 (2)**: 291 – 298.
- Robertson J.G. y Lyttleton P. (1984).** Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *Journal of Cell Science.* : 147–157.
- Roche P., Debellé F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., TruchetG., Dénarié J., Promé J-C. (1991)** .Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* **67(6)**:1131-43.

- Rolfe B. G., Gresshoff P. M. (1988).** Genetic analysis of legume nodulation initiation. *Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology* **39**:297–319.
- Roponen I (1970).** The effect of darkness on the leghemoglobin content and amino acid levels in the root nodules of pea plants. *Physiol Plant* **23**: 452–460.
- Rowe R. I. y Eckhert C. D. (1999).** Boron is required for zebrafish embryogenesis. *Journal of Experimental Biology*. **202(12)**:1649-1654.
- Rudd J. J. y Franklin-Tong V. E. (2001).** Unravelling response-specificity in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathways in plant cells. *New Phytologist* **151(1)**:7–33.
- Ruiz J., Bretones G., Baghour M., Belakbir A., Romero L. (1998),** Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves, *Phytochem.* **48**: 2-272.
- Salzwedel J. L., Dazzo F.B. (1993).** pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol Plant Microbe Interact.* **6(1)**:127-34.
- Sánchez J. P., Duque P. y Chua N. (2004).** ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *The Plant Journal* **Volume 38 (3)**:381 – 395.
- Sánchez F., Padilla J. E, Perez H. y Lara M. (1991).** Control of Nodulin Genes in Root-Nodule Development and Metabolism. *Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* **42**:507-528.
- Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D. y Puppo A. (2001)** Oxidative Burst in Alfalfa-Sinorhizobium meliloti Symbiotic Interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* **14(1)**:86–89.
- Santos R., Hérouart D., Puppo A., Touati D. (2000).** Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in rhizobium-legume symbiosis. *Mol Microbiol.* **38(4)**:750-9.
- Sauerwein W. & Verdus M.C. (2001)** Methodological developments for application to the study of physiological boron and to boron neutron capture therapy. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **19**:623–657.

- Savouré A., Sallaud C., El-Turk J., Zuanazzi J., Ratet P., Schultze M., Kondorosi A., Esnault R. y Kondorosi E. (1997). Distinct response of Medicago suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *Plant J.* **11**: 277-287.
- Savouré A., Magyar Z., Pierre M., Brown S., Schultze M., Dudits D., Kondorosi A., and Kondorosi E. (1994). Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in microcallus Medicago suspensions. *EMBO J.* **13**:1093-1102.
- Scheres B., van Engelen F., van der Knap E., van de Wiel C., van Kammen A., y Bisseling T. (1990). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**: 687–700.
- Schlaman H.R.M., Okker R.J.H. y Lugtenberg B.J.J. (1992). Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. *J. Bacteriol.* **174**:5177-5182.
- Schultze M., Kondorosi E., Kondorosi A., Staehelin C., Mellor R.B., Boller T. (1993). The sulfate group on the reducing end protects Nod signals of *R. meliloti* against hydrolysis by Medicago chitinases. In R Palacios, J Mora, WE Newton, eds, New Horizons in Nitrogen Fixation. *Kluwer*, Dordrecht, The Netherlands, pp159-164.
- Schwarzkopf M., Knobeloch K.-P., Rohde E., Hinderlich S., Wiechens N., Lucka L., Horak I., Reutter W. y Horstkorte R. (2002). Sialylation is essential for early development in mice. *PNAS.* **99**(8):5267–5270
- Shaw S.L. y Long, S.R. (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol* **132**: 2196–2204.
- Sherrier D. J., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A., Brewin N. J. (1997)I. Immunocytological evidence for abnormal symbiosome development in nodules of the pea mutant line Sprint2Fix<sup>-</sup> (sym31). *Protoplasma.* **199**:57-68.
- Shimizu-Sato S., Mori H. (2001). Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* **127**:1405–13.

**Shkol'nik M. Y. , Ilyinskaya N. L. (1975).** The effect of boron deficiency on the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in plants showing different requirements for boron. *Fiziologiya Rastenij*. **22**: 801-805.

**Shkol'nik, M.Y. (1974).** General conception of the physiological role of boron in plants. *Fiziolog Rast* **21**: 174-186.

**Shkol'nik M.J., Krupnikova T.A., Dmitrieva N.N. (1964).** Influence of boron deficiency on some aspects of auxin metabolism in the sunflower and corn. *Sov Plant Physiol* **11**: 164-1.

**Shkol'nik M. Y. y Kositsy A V.. (1962).** Effect of boron on rate of incorporation of  $P^{32}$  into nucleic acids of sunflower. *Dokl. Bio. Sci. Sect...I.B.S. Transl.* **144**: 622-24.

**Sieberer B. J., Timmers A. C., Emons A. M. (2005).** Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Mol Plant Microbe Interact.* **18(11)**:1195-204.

**Sieberer B. J., Timmers A. C., Lhuissier F. G., Emons A. M. (2002).** Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiol.* **130(2)**:977-88.

**Sikorski M. M., Biesiadka J., Kasperska A. E. , Kopcinska J., Lotocka B., Golinowski W. (1999).** Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Sci* **149**:125–37.

**Skorupska A., Bialek U., Urbanik-Sypniewska T., van Lammeren A. (1995).** Two types of nodules induced on *Trifolium pratense* by mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii deficient in exopolysaccharide production. *J Plant Physiol.* **147**:93–100.

**Smit G., Kijne J. W. y Lugtenberg B. J. (1989).** Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a  $Ca^{2+}$ -dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **171**:5-572.

**Smit, G., Kijne J. W. y B. Lugtenberg J. J. (1987).** Involvement of both cellulose fibrils and a  $Ca^{2+}$ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **1**:4294-4301.

**Smith T. A., y Barker J. H. A. (1988).** The di- and polyamine oxidase of plants. Progress in Polyamine Research. V. Zappia y A. E. Pegg, eds. *Plenum Press*, New York. 573-587.

**Soto M. J., Domínguez-Ferreras A., Pérez-Mendoza D., Sanjuán J. y Olivares J.. (2009).** Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant–bacteria interactions. *Cellular Microbiology* **11**(3):381-8.

**Soto M. J., Sanjuán J. y Olivares J. (2006)** Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**:3167-3174.

**Spaink H. P. (1995).** The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**:345-368.

**Spaink H. P., Sheeley D. M., van Brussel A. A., Glushka J., York W. S., Tak T., Geiger O., Kennedy E. P., Reinhold V. N., Lugtenberg B. J. (1991).** A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**: 125–130.

**Sprent J. (1980).** Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some leguminosae. *Plant, Cell and Environment* **3**: 35–43.

**Srivastava S., Emery R. J. N., Rahman M. H., Kav N. N. V. (2007).** A crucial role for cytokinins in pea ABR17-mediated enhanced germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under saline and low temperature stresses. *J Plant Growth Reg.* **26**:26–37.

**Srivastava S., Rahman M. H., Shah S. y Kav N. N. V (2006 a).** Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* **4**(5):529 – 549.

**Srivastava S. , Emery R. J. N., Kurepin L. V., Reid D. M., Fristensky B., Kav N. N. V. (2006 b).** Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. *Plant Growth Reg.* **49**:17–25.

**Srivastava S., Fristensky B., Kav N. N.V. (2004).** Constitutive expression of a PR 10 protein enhances the germination of *Brassica napus* under saline conditions. *Plant Cell Physiol.* **45**:1320–1324.

- Stachelin C., Schultze M., Kondorosi É. y Kondorosi Á. (1995).** Lipo-chitooligosaccharide Nodulation Signals from *Rhizobium meliloti* Induce Their Rapid Degradation by the Host Plant Alfalfa. *Plant Physiol.* **108**:1607-1 61.
- Stachelin C., Granado J., Müller J., Wiemken A., Mellor R. B. , Felix G., Regenass M., Broughton W. J., Boller T. (1994a).** Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2196-2200.
- Stachelin C., Schultze M., Kondorosi E., Mellor R. B., Boller T., Kondorosi A. (1994b).** Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J* **5**:319-330.
- Stachelin C., Granado J., Müller J., Wiemken S., Mellor R.B., Felix G. (1994).** Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2196–2200.
- Stachelin C., Müller J., Mellor R. B., Wiemken A., Boller T. (1992).** Chitinase and peroxidase in effective (fix+) and ineffective (fix-) soybean nodules. *Planta* **187**: 295-300.
- Stals H., Casteels P., Van Montagu M. y Inzé D. (2000)** Regulation of cyclin-dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **43**: 583-593.
- Steen A., Buist G., Horsburgh G. J., Venema G., Kuipers O. P., Foster S. J., Kok J. (2005).** AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *FEBS J* **272**: 2854–2868.
- Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. (1993).** Plant “pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**:687-706.
- Stougaard J. (2000).** Update on nodule development. Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiol.* **124**: 531-540.
- Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D. y Singer F. (1981).** Production of clones of homozygous diploid fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**: 293-296.

**Suganuma N, Tamaoki M, Kouchi H (1995).** Expression of nodulin genes in plant-determined ineffective nodules of pea. *Plant Mol Biol* **28**:1027–1038.

**Szczygłowski K., Shaw R. S., Wopereis J., Copeland S., Hamburger D., Kasiborski B., Dazzo F. B. y de Bruijn F. J. (1998).** Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 684–7.

**Takahashi Y., Ogra Y., Suzuki K. T. (2004).** Synchronized generation of reactive oxygen species with the cell cycle. *Life Sciences* **75**: 301–311.

**Takano J, Miwa K, Fujiwara T. (2008).** Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci.* **(8)**:451-7.

**Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wiren N., Fujiwara T. (2006).** The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell.* **18**:1498–1509.

**Takano J., Noguchi K., Yasumori M., Kobayashi M., Gajdos Z., Miwa K. (2002).** *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature.* **420**:337–340.

**Tanada T. (1978).** Boron, Key element in the actions of phytochrome and gravity?. *Planta.* **143**(1).

**Tanaka M., Wallace I. S. , Takano J., Roberts D. M. , Fujiwara T. (2008).** NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **20**(10):2860-75.

**Tang P. M., dela Fuente RK. (1986).** The Transport of Indole-3-Acetic Acid in Boron- and Calcium-Deficient Sunflower Hypocotyl Segments. *Plant Physiol.* **81**(2):646-650.

**Tate R., Patriarca E. J., Riccio A., Defez R. y Iaccarino M. (1994).** Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**:582–589.

**Tellström V., Usadel B., Thimm O., Stitt M., Küster H. y Niehaus K. (2007).** The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defence-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **143**: 825–837.



- Thellier M., Chevalier A., His I., Jarvis M., Lovell M.A., Ripoll C., Robertson D., Sauerwein W. y Verdus M.C. (2001)** Methodological developments for application to the study of physiological boron and to boron neutron capture therapy. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **19**:623–657.
- Thellier M., Chevalier A., His I., Jarvis M., Lovell M.A., Ripoll C., Robertson D., Thummler F. y Verma, D.P.S. (1987).** Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**:14730-14736.
- Timmers A. C., Soupène E., Auriac M. C., de Billy F., Vasse J., Boistard P., Truchet G. (2000).** Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**(11):1204-13.
- Timmers A. C. J., Auriac M-C y Truchet G. (1999).** Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**:3617-3628.
- Traving P. y Schauer R. (1998).** Structure, function and metabolism of sialic acids. *C.M.L.S. Cell. Mol. Life Sci.* **54** :1330-1349.
- Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Promé J-C., Dénarié J..(1991).** Sulphated lipo-oligosaccharide signals of Rhizobium meliloti elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- Uheda E, Syono K (1982)** Physiological role of leghaemoglobin heterogeneity in pea root nodule development. *Plant Cell Physiol* **23**:75–84.
- Van de Velde W., Pérez-Guerra J. C., de Keyser A., de Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M. y Goormachtig S. (2006).** Aging in Legume Symbiosis. A Molecular View on Nodule Senescence in *Medicago truncatula*1. *Plant Physiology.* **141**:711–720.
- Van Loon L. C., Pierpoint W. S., Boller T., Conejero V. (1994).** Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep.* **12**:245–264.

- VandenBosch K. A., Bradley D. J. , Knox J.P., Perottol S., Butcher G. W. y Brewin N. J.(1989).** Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *The EMBO Journal*. **8(2)**:335 – 342.
- Vasse J., de Billy F., Truchet G. (1993).** Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J* **4**:555-566.
- Vasse J., Debilly, F., Camut S. y Truchet G. (1990).** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriology* **172(8)**: 4295-4306.
- Varki A., Hooshmand F., Diaz S., Varki N. M. y Hedrick S. M. (1991).** Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase. *Cell* **65**:65–74.
- Verma D. (1992).** Signals in Root Nodule Organogenesis and Endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*. **4(4)**: 373–382.
- Verstraeten S. V., Lanoue L., Keen C. L., Oteiza P. I. (2005).** Relevance of lipid polar headgroups on boron-mediated changes in membrane physical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **438**:103–110.
- Vinardell J. M., Fedorova E., Cebolla A., Kevei Z., Horvath G., Kelemen Z., Tarayre S., Roudier F., Mergaert P., Kondorosi A. y Kondorosi E.(2003).** Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**: 2093–2105.
- Wainwright I. M., Palmer R. L., y Dugger W. M. (1980).** Pyrimidine Pathway in Boron-deficient Cotton Fiber. *Plant Physiol.* **65**:893-896.
- Wallace I. S., Choi W. G., Roberts D.M. (2006).** The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim. Biophys. Acta*. **1758**:1165–1175.
- Walter M. H., Liu J. W., Wünn J., Hess D. (1996).** Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (Ypr10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur J Biochem*. **239**:281–93.

- Wang H., Kesinger J. W., Zhou Q., Wren J. D., Martin G., Turner S., Tang Y., Frank M. B., Centola M. (2008).** Identification and characterization of zebrafish ocular formation genes. *Genome*. **51(3)**:222-35.
- Wang QL, Lu LD, Wu XQ, Li YQ, Lin JX. (2003).** Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiology*. **23**:345–351.
- Wang Z. Y., Tang Y. L., Zhang F. S., Wang H. (1999).** Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. *J. Plant Nutr.* **22**:543–550.
- Wang G., Römheldd V., Lia C., Bangerth F. (2006).** Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of pea plants (*Pisum sativum* L.). *Journal of Plant Physiology* **163**: 591—600.
- White J., Prell J., James E. K. y Poole P. (2007).** Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiol.* **144(2)**: 604–614.
- Whitehead L. F. y Day D. A. (1997).** The peribacteroid membrane Source: *Physiologia Plantarum*, **100(1)**:30-44(15).
- Wilson C. M. (1961).** Cell wall carbohydrates in tobacco pith parenchyma as affected by boron deficiency & by growth in tissue culture. *Plant Physiol.* **36(3)**: 336–341.
- Winkel-Shirley B. (2001).** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**: 485–493.
- Wisniewski J. P., Rathbun E. A., Knox J. P. y Brewin N. J. (2000).** Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:413-420.
- Wisniewski-Dye F. y Downie J. A. (2002).** *Quorum-sensing* in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. General Mole. Microbiol.* **81**: 397–407.
- Wittenberg J. B., Bergersen F. J., Appleby C. A. y Turne, G. L. (1974).** Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* **249**:4057 -4066.

- Wojtaszek P., Trethowan J., y Bolwell G. P. (1995).** Specificity in the immobilization of cell-wall proteins in response to different elicitor molecules in suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* **28**:1075-1087.
- Wolf B. (1974)** Improvement in the Azometine H method for determination of boron. *Communication in Soil Science Plant Analysis*, **5**: 39-44.
- Wood E. A., Butcher G. W., Brewin N. J. y Kannenberg E. L. (1989).** Genetic derepression of a developmentally regulated lipopolysaccharide antigen from *Rhizobium leguminosarum* 3841. *J Bacteriol.* **171(9)**: 4549-4555
- Yamamoto T., Nakai K., Matsumura A. (2008).** Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Lett.* **18**:262(2):143-52.
- Yang W. C., de Blank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., A. van Kammen A., Franssen H. y Bisseling T. (1994).** Rhizobium Nod Factors Reactivate the Cell Cycle during Infection and Nodule Primordium Formation, but the Cycle Is Only Completed in Primordium Formation. *The Plant Cell.* **6(10)**:1415-1426.
- Yang W., Yan J., Springsteen G., Deeter S. y Wang B. (2003).** A Novel Type of Fluorescent Boronic Acid That Shows Large Fluorescence Intensity Changes Upon Binding with a Carbohydrate in Aqueous Solution at Physiological pH. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**: 1019–1022.
- Yu Q., Baluška F., Jasper F., Menzel D. y Goldbach H. E. (2003).** Short-term boron deprivation enhances levels of cytoskeletal proteins in maize, but not zucchini, root apices. *Physiologia Plantarum.* **117 (2)**:270 – 278.
- Zehr J. P. y Mellon M. T. y Zani S. (1998).** New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes. *Applied and Environmental Microbiology.* **64(9)**: 3444-3450.
- Zhan L-H. (2003).** *Quorum quenching* and proactive host defence .*Trends in Plant Science*, **8(5)**:238-244.